



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**Fenotipos Biológicos del Virus de la Inmunodeficiencia
Humana en pacientes en diversas etapas de la
enfermedad.**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A

DANIEL POPOCA VARGAS

TUTORA

**Q. CLIN. KLINTSY JULIETA HERNÁNDEZ
TORRES**



2007

**FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM**



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Datos del jurado

<p>1. Datos del alumno Popoca Vargas Daniel 56 81 12 29 Universidad Nacional Autónoma de México Facultad de Ciencias Biología 9419394-5</p>
<p>1. Datos del tutor Q. C. Klinsky Julieta Torres Hernandez</p>
<p>2. Datos del sinodal 1 Dr. Héctor Enrique Espinosa Arciniega</p>
<p>3. Datos del sinodal 2 Dr. Joel Armando Vázquez Pérez</p>
<p>4. Datos del sinodal 3 M. en C. Santiago Ávila Ríos</p>
<p>5. Datos del sinodal 4 Q.F.B. Criselda Mendoza Milla</p>
<p>6. Datos del trabajo Fenotipos biológicos del Virus de la Inmunodeficiencia Adquirida en pacientes en diversas etapas de la enfermedad. 68 p. 2007</p>

Agradecimientos

A Leticia y Mario.

A Mario y Naomi.

A Klintzy.

A la U.N.A.M.

A mi familia y mis amigos.

ÍNDICE

Portada	1
Agradecimientos	2
Índice	3
Introducción	
Antecedentes	5
Estructura y ciclo de replicación del VIH	9
Historia natural de la infección por VIH	18
Receptores y correceptores de VIH	22
Fenotipos del VIH	28
Métodos	
Separación de CMSP de donador VIH negativo	33
Congelación	34
Descongelación	34
Cultivo de VIH a partir de plasma con Heparina	35
Ensayo de Ag p24 del VIH de COULTER <i>in vitro</i> Diagnosticum	36
Separación de células T CD8+ de paciente	37
Determinación de pureza por citometría de flujo	38
Cultivo de VIH a partir de CMSP de paciente sin cT CD8+	39
Ensayo de fenotipo biológico en células MT-2	40
Análisis clínicos	41
Análisis estadístico	41
Resultados	43

Discusión	53
Conclusiones	60
Bibliografía	62

INTRODUCCIÓN

Antecedentes.

El Virus de Inmunodeficiencia Humana (VIH) es un retrovirus,¹ clasificado así por su capacidad de transcribir ADN a partir de ARN viral por medio de la proteína transcriptasa inversa.² Pertenece a la familia de los lentivirus, que se distingue de otros retrovirus por algunas características morfológicas inusuales, tales como un núcleo de forma cilíndrica o cónica y la presencia de varios genes con funciones regulatorias (como *tat* y *rev*) que no están presentes en otros genomas retrovirales. Otra característica es la expresión bifásica de genes virales.

El VIH se caracteriza por presentar periodos largos y variables de incubación, replicación persistente, introducir manifestaciones neurológicas y por la destrucción de poblaciones de células específicas (hematológicas e inmunológicas).³

Se ha reportado que la replicación del VIH *in vitro* es posible en múltiples líneas celulares, entre las que se incluyen células dendríticas de sangre periférica, células dendríticas foliculares, células B, células asesinas naturales o natural killer (NK)⁴, eosinófilos, precursores de células CD4+ de médula ósea, células precursoras tímicas inmaduras, células T CD8+, células de Langerhans, megacariocitos, astrocitos, oligodendroglia, células epiteliales renales, células cervicales, células de mucosa en intestino y recto, células trofoblásticas, así como células del hígado, pulmón, glándulas salivales, ojos, próstata, testículos y adrenales.^{5,6} Sin embargo solamente se ha descrito

infección *in vivo* en algunos tipos celulares, principalmente en células que conforman el sistema inmune, es decir linfocitos T CD4+ y células de la línea de macrófagos y monocitos. La disminución progresiva de células T CD4+ en el paciente deriva en una condición conocida como síndrome de inmunodeficiencia adquirida (SIDA) caracterizada por la aparición de enfermedades oportunistas como tuberculosis, neumonía, candidiasis, etc. Estas complicaciones derivan en la muerte del paciente.

El VIH fue aislado y descrito por primera vez en 1983 en Francia⁷, después de dos años de búsqueda del agente que causaba la muerte de sujetos aparentemente sanos entre grupos de riesgo (homosexuales y usuarios de drogas intravenosas) por enfermedades que el sistema inmune podría controlar normalmente.⁸ En este mismo año se acuñó el término SIDA para definir la condición que parecía presentarse únicamente en los llamados grupos de riesgo, idea que cambió rápidamente al surgir nuevos casos de hombres y mujeres infectados fuera de estos grupos.

Existen varias dificultades para poder establecer claramente los alcances exactos que tiene la epidemia de SIDA en el mundo. Uno de los principales problemas es la falta de diagnóstico de muchos pacientes infectados, lo que contribuye a su vez a la propagación de la enfermedad. Otro obstáculo es la poca cobertura y seguimiento de encuestas y casos en varios países, existiendo también desigualdad de datos y casos entre diferentes regiones. Aún así, el Programa Conjunto de las Naciones Unidas sobre el VIH/SIDA (ONUSIDA) estima que el número de casos de infectados en el mundo va en aumento, aún después de años de investigación y de políticas de prevención y tratamiento (Tabla 1). Según

ONUSIDA, para la mitad del 2006 había un total de 38.5 millones de pacientes en el mundo viviendo con el VIH, de los cuales 4.3 millones fueron nuevas infecciones y hasta ese momento habían muerto 2.9 millones de personas.⁹

Tabla 1. Número de personas infectadas por el VIH registradas por ONUSIDA hasta junio del año 2006. ONUSIDA 2006

Región	Personas con VIH (millones)
Asia	7.8
África Subsahariana	24.7
África del Norte y Oriente medio	0.46
Europa Oriental y Asia Central	1.7
América Latina	1.7
Norteamérica, Europa Occidental, Nueva Zelanda y Australia	2.2

En México, desde 1983 (año en que se detectó la epidemia en nuestro país) hasta junio del 2006, el Registro Nacional de Casos de SIDA había contabilizado en forma acumulada 105,170 casos de personas infectadas, de las cuales el 83.1% eran hombres, el 16.9% mujeres, y el 78.7% se encontraba en el intervalo entre los 15 y los 44 años.¹⁰ Estas cifras muestran que a diferencia de lo que se observa en el contexto internacional, en México el SIDA tiene mayor incidencia entre la población masculina. Por cada cinco casos de VIH/SIDA en hombres se observa un caso en mujeres. Algunas estimaciones de ONUSIDA calculan que en el país viven alrededor de 180,000 personas infectadas con el VIH, de las cuales una gran parte no ha sido documentada.¹¹

Estructura y ciclo de replicación del VIH.

Una partícula viral está conformada por una envoltura constituida por una bicapa fosfolipídica derivada de la membrana plasmática de la célula blanco¹² (Fig. 1). En esta envoltura se encuentran las glucoproteínas virales de membrana gp120 y gp41, codificadas por el gen *env*, que interactúan con la superficie y las proteínas membranales de la célula blanco.^{13,14} En el interior de la partícula viral existen varias proteínas que envuelven el genoma del virus, conformado por dos cadenas idénticas de ARN, cada una de ellas con 9.8 kilobases de longitud¹⁵ (Fig. 2). Como en otros retrovirus, dichas cadenas tienen estructuras terminales a cada extremo conocidas como repeticiones terminales largas (LTR) que regulan la integración viral al genoma de la célula infectada, así como la expresión genética del virus y su replicación.¹⁶ El gen *gag* codifica las proteínas de la cápside, la matriz y la nucleocápside, mientras que el gen *pol* codifica las proteínas con actividad enzimática encargadas de la replicación viral, es decir, la integrasa, la transcriptasa inversa y la proteasa.¹⁷

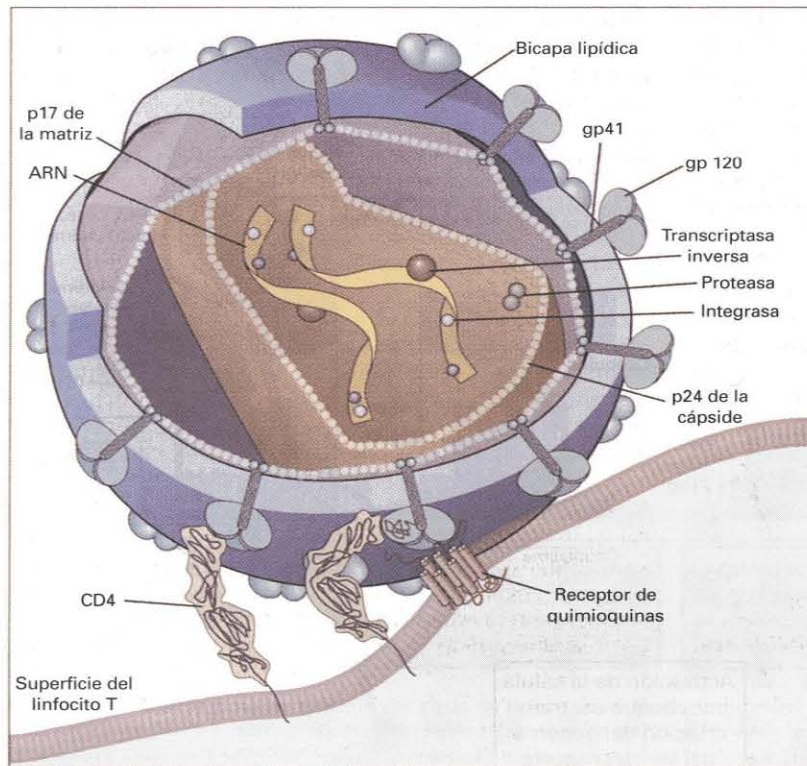


Figura 1. Estructura del virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1 (VIH-1). Se muestra un virión junto a la superficie de una célula T. El VIH consta de dos cadenas idénticas de ARN (el genoma viral) y las enzimas asociadas; transcriptasa inversa, la integrasa y la proteasa, empaquetadas en un centro cónico compuesto de la proteína de la cápside p24, con una matriz circundante de proteína, todo ello rodeado de una envoltura de membrana fosfolipídica derivada de la célula blanco. Las proteínas de membrana codificadas por el virus (gp41 y gp 120) se encuentran unidas a la envoltura. Las moléculas CD4 y los receptores de quimioquinas de la superficie de la célula blanco actúan como receptores del VIH-1.¹⁸

Además de estos genes básicos, hay otros seis genes, dos reguladores (*tat* y *rev*) y cuatro accesorios:

- *vpr* se une al precursor de *gag*, promueve la importación nuclear del ADN y detiene el ciclo celular en G2.
- *tat* o transactivador es necesario para la elongación de los transcritos virales.
- *rev* se encarga de la exportación nuclear del ARN viral no procesado, se une a ARNm permitiendo que

las proteínas virales se produzcan en cualquier punto del ciclo celular.

- *vpu* regula negativamente la expresión de CD4 en la célula infectada y potencia la liberación del virus de la célula.
- *vif* modula la infectividad de los virus inhibiendo la síntesis de ADN proviral, se desconoce si inhibe la transcripción inversa, el desenvolvimiento viral o la estabilidad de la nucleocápside, pero se sabe que los viriones mutantes de *vif* acoplan la nucleocápside de manera inapropiada.¹⁹
- *nef* regula negativamente la expresión de CD4 en la célula infectada y potencia la liberación del virus de la célula, también regula negativamente la expresión de moléculas MHC I en la célula blanco, regulando la activación de las células T.

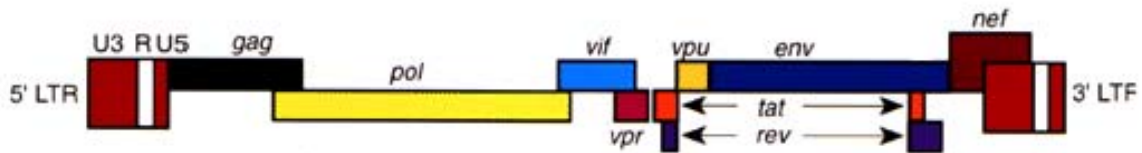


Figura 2. Mapa genómico del VIH. Se muestra la disposición de los genes en el ADN proviral. A los extremos se identifican las repeticiones terminales largas (LTR) que regulan la integración viral al genoma de la célula huésped, así como la expresión genética del virus y la replicación. Las regiones en donde se sobreponen las secuencias entre dos genes indican sitios en donde la misma secuencia codifica dos proteínas diferentes.²⁰

En la superficie de la envoltura viral, una capa lipídica derivada de la formación de viriones en la membrana de la célula, encontramos a las dos proteínas encargadas del reconocimiento e internalización celular. Como subunidad del precursor de la proteína gp160, está gp120, la cual se encarga de reconocer y unirse al receptor principal en la superficie celular CD4,

estabilizando la unión y después reconoce al correceptor, en este caso los receptores de quimiocinas, CCR5 y CXCR4 (Fig.3). La interacción de gp120 con CD4 y el correceptor induce un cambio conformacional en la estructura de gp120, exponiendo el dominio de fusión de gp41 y provocando la unión de la membrana celular con la envoltura del virus y la posterior entrada del material genético viral en el citoplasma celular y en el núcleo. La disposición de las proteínas del complejo gp160 se estudió en estructuras de dímeros y tetrámeros pero se demostró que las unidades transmembranales de los retrovirus se organizan generalmente en trímero²¹, en el caso del VIH, antecediendo a gp41 hay tres subunidades gp120, que ha mostrado una gran variabilidad genética en las denominadas regiones hipervariables (V) que están expuestas en la superficie de la proteína, mientras que las regiones conservadas (C) permanecen en el centro.²² El papel de gp 120 es el establecimiento de contacto no específico en las células blanco con los azúcares de los glicolípidos y glucoproteínas de la superficie celular e interactuar con los receptores en la superficie celular.²³ Estas simples interacciones no son suficientes para desencadenar la infección ya que se han podido bloquear *in vitro* usando algunos azúcares²⁴, pero su papel es importante en el reconocimiento virus-célula. La interacción del virus con la superficie de la célula resulta en el cambio conformacional del complejo gp160, ya que el contacto con CD4 induce el desplazamiento de gp120 y por lo tanto quedan descubiertas las regiones variables V1-V5, que también son inducidas a cambiar por la unión de gp120 con el correceptor, induciendo a gp41 a proyectar un péptido de fusión que entra en contacto

con la superficie celular e induce la fusión de membranas a través de un poro.^{25,26,27}

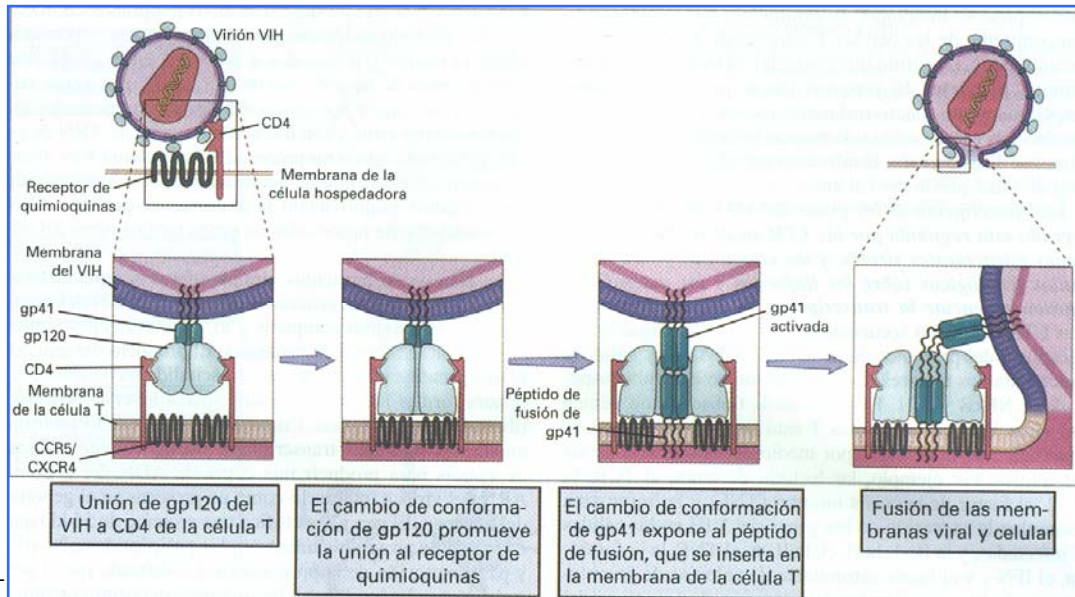


Fig. 4. Las proteínas virales de envoltura gp120 y gp41 con los receptores de superficie celular CD4 y el correceptor CCR5 o CXCR4. La unión de gp120 se da con receptor celular CD4, lo que promueve un cambio conformacional en el complejo gp160, cuando la subunidad gp120 deja al descubierto a gp41 y este interactúa con el correceptor, se proyecta un péptido de fusión que induce la fusión celular.²⁸

Después de que el virus entra en la célula, la cápside y sus nucleoproteínas son liberadas en el citoplasma, en donde se internaliza el ARN genómico del VIH en el citoplasma y se inicia la transcripción inversa, mediada por la enzima transcriptasa inversa (Fig. 4).

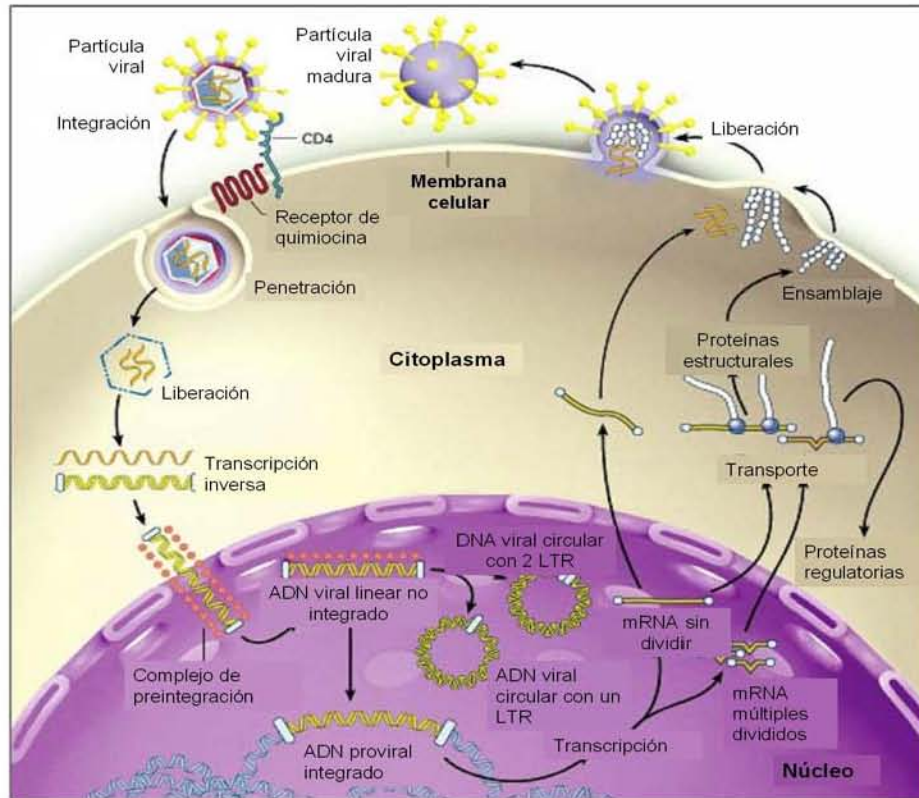


Fig. 4. Ciclo de replicación del VIH-1. Se muestran los pasos secuenciales de la replicación de VIH, desde la infección inicial de una célula blanco, hasta la liberación de un nuevo virión. Cada célula infectada produce en realidad muchos viriones, cada uno de ellos con capacidad de infectar células, lo que tiene como consecuencia la amplificación del ciclo infeccioso. El número de células productivamente infectadas varía entre 1×10^7 y 1×10^8 células con una media entre 50 a 100 copias de ARN por célula. La media del número de copias por célula y el número de células con alta concentración de ARN viral (aproximadamente 200 copias por célula) es mucho menor que las células infectadas por VIH in vitro (1 100 copias por célula con un máximo de 4 000 copias por célula)²⁹

El ADN viral, junto con algunas proteínas de la cápside, Vpr e integrasa, penetran en el núcleo, donde el ADN viral es integrado al ADN de la célula infectada, mediante la enzima integrasa. El ADN viral integrado en el genoma de la célula huésped es conocido como provirus, cuya transcripción puede inactivarse o transcribir cantidades escasas de proteínas virales, permaneciendo latente por años a pesar del tratamiento

antirretroviral.³⁰ El VIH, al igual que otros virus es un parásito intracelular molecular, que depende de la maquinaria de biosíntesis de la célula para completar su ciclo de replicación. El virus actúa de tal forma que emplea varios pasos de la síntesis de ácidos nucleicos y proteínas de la célula blanco para coordinar la replicación viral. La interacción entre el factor nuclear kappa B (NF-κB) o el factor nuclear de células T activadas (NFAT) son los principales ejemplos de cómo el virus utiliza vías de señalización en células con alto grado de actividad biosintética.³¹ La transcripción del genoma viral requiere que la célula se encuentre en estado de activación, debido a que las regiones LTR del VIH son reconocidas por los factores de transcripción NF-κB y NFAT, inducidos por señalización mediada por antígenos, citocinas, activadores policlonales como la fitohemaglutinina, lípidos bacterianos y otros. NFAT es necesario para la expresión de genes que codifican a IL-2, IL-4, TNF y otros genes de citocinas, mientras que NF-κB se activa en respuesta a las señales de TCR y es esencial para la síntesis de citocinas. En el proceso de transcripción, la proteína Tat, producto del gen *tat*, se une al ARNm y aumenta la capacidad de la ARN polimerasa en varios cientos de veces, completando la transcripción de manera más rápida y eficiente. Tat también controla de manera indirecta la expresión de Rev.³²

Durante la transcripción del ADN pueden ser producidos más de treinta ARNm alternativos, cada uno de los cuales contiene un marco de lectura para la producción de más de una proteína. Los ARNm del VIH pueden ser de tres tipos: 1) ARN no procesado, que es un transcrito completo para generar los precursores de Gag y Gag-Pol; 2) ARN procesado incompleto, que generan Env, Vif, Vpu,

Vpr y la forma de hexón de Tat, y 3) ARN procesado, que expresan Rev, Nef y la forma de dos hexones de Tat.³³

La expresión de los genes virales se divide en dos etapas reguladas por la proteína Rev, que marca el momento del cambio de proteínas tempranas a tardías. En la etapa temprana se expresan los genes reguladores, como *rev*, *tat* y *nef*, que son exportados desde el núcleo y traducidos a proteínas en el citoplasma. En la etapa tardía se expresan los genes estructurales *env*, *gag* y *pol* y se empaquetan los genomas virales completos.

El ensamblaje de las partículas virales maduras comienza cuando se han producido las secuencias de ARN viral completas. Las proteínas de la cápside que son necesarias para dicho ensamblaje son las codificadas por los genes *gag* y *pol*.

Finalmente, el complejo con las proteínas y su envoltura es transportado a la superficie celular y empaquetado en una envoltura de capa de la membrana celular bilipídica, que es liberado por gemación. Si la tasa de producción es lo suficientemente elevada (aprox. 2,000 viriones/célula) puede causar la lisis y muerte celular, lo cual es un importante mecanismo del efecto citopático del VIH.

Uno de los grandes problemas al que nos enfrentamos en la búsqueda de tratamiento contra este virus es su gran capacidad de mutación como consecuencia de la alta tasa de error de la enzima transcriptasa inversa, que cambia aproximadamente 1 nucleótido por cada $8 \text{ ó } 10 \times 10^3$, lo que se refleja en una gran variabilidad³⁴, incrementada por la incapacidad para corregir errores antes de integrar el ADN viral al genoma celular y así iniciar la producción de las proteínas virales necesarias para la creación de nuevos viriones. Esto favorece la aparición

de mutaciones muy rápidamente, permitiéndole al virus escapar a la respuesta inmune del paciente, además de facilitar el surgimiento de cepas resistentes a fármacos, no pudiéndose implementar tratamientos farmacológicos eficaces.

Los viriones liberados al medio extracelular son capaces de sobrevivir durante 6 horas³⁵, periodo en el cual requieren encontrar una nueva célula para continuar el ciclo, mientras que la vida media de las células infectadas está en el intervalo de entre 1.5 y 2.1 días.³⁶ En pacientes sin tratamiento, las células infectadas de vida larga, como células T en reposo y macrófagos solo representan una contribución menor a la viremia total.³⁷ La transmisión de un individuo a otro puede darse por vía sexual, sanguínea y perinatal, y en todos los casos se requiere que haya transmisión de viriones libres viables o células infectadas.

Historia natural de la infección por VIH.

El curso de la enfermedad comienza desde el momento de la infección, conocido como infección aguda. En esta etapa inicial se establece un periodo sintomático de dos a tres meses, en el que se puede presentar fiebre, diarreas, linfadenopatía, sudoraciones nocturnas y malestar general, síntomas típicos de las infecciones virales. En este periodo, el virus se replica rápidamente debido a la ausencia de una respuesta inmune específica, permitiendo que la carga viral (número de copias de ARN-VIH / ml) aumente drásticamente.

Basados en el modelo del Síndrome de Inmunodeficiencia Simiana (SIV), en la infección por transmisión sexual y en las etapas aguda y temprana de la infección por VIH,

se ha encontrado que ambos virus (SIV y VIH) replican predominantemente en células T CD4+, en el punto de entrada del virus que generalmente son mucosas, donde se establece el punto más importante de replicación viral activa debido a la alta concentración de células blanco y la eliminación de células T CD4+ de memoria efectoras por su alta expresión de CCR5+, correceptor del fenotipo viral R5 que normalmente establece la infección primaria.³⁸

Los fenotipos virales linfotrópicos (X4) pueden infectar células T CD4+ en cualquier etapa celular, mientras que los macrófago trópicos (R5) pueden infectar células T CD4+ activadas pero no infectan fácilmente a las células en reposo por la baja expresión de CCR5+ y en caso de que ocurra infección de éstas células, se bloquea la importación nuclear del complejo de preintegración viral con el ADN viral ya transcrito por la transcriptasa inversa, hasta que la célula es activada por antígenos, aquí la maquinaria celular reanuda la integración y el resto del proceso.^{39,40,41} Entre el 30-60% de las células T CD4+ de memoria son infectadas en la etapa aguda y entre el 24-48% de todas las células T CD4+ son eliminadas en las primeras dos semanas de la enfermedad.⁴² La infección se propaga no sólo en células T activadas, sino también en células T en reposo. Las células infectadas y activadas corresponden a una población de corta vida, que producen la mayor cantidad de virus, mientras que las células T en reposo tienen la capacidad de persistir en presencia de tratamiento antirretroviral, lo cual representa un reto en el desarrollo de vacunas o tratamientos para la erradicación viral.⁴³

A medida que progresa la infección, el sistema inmune muestra una respuesta semejante a la observada ante

otros virus y cuyo fin es la eliminación del virus presente en sangre y en células T sanguíneas. La respuesta inicial a la infección por el VIH se caracteriza por una expansión masiva de los linfocitos T citotóxicos (CTL) CD8+ específicos a péptidos derivados de las proteínas del VIH, que pueden representar hasta el 10% de las células T CD8+ circulantes en sangre. El control principal de la infección por VIH, reflejado por la reducción de la viremia (carga viral) y la consecuente transición a la etapa intermedia o de latencia clínica se debe a esta respuesta de CTL.⁴⁴

Posteriormente se establece un periodo de latencia clínica, conocido como etapa temprana-intermedia, en la que la respuesta inmune controla la infección y estabiliza la carga viral dentro de los primeros 9 meses. En esta etapa se establece una dinámica de producción y eliminación del virus relativamente estable, donde la mayor parte del virus en plasma es producido por células recién infectadas (hasta 1×10^8 nuevas células infectadas por día en pacientes sin tratamiento).⁴⁵ Por otro lado, dada la naturaleza de la respuesta inmune, algunas de las células T CD4+ infectadas, en lugar de morir debido a los efectos citopáticos o citolíticos, logran entrar en estado de reposo con el ADN viral ya integrado o aún sin integrarse.

La cantidad de células T CD4+ infectadas es aún controversial, pero hay evidencia de que las células T CD4+ en reposo o de memoria con ADN no integrado constituyen el 1% mientras que entre la fracción de células con provirus integrado y con capacidad de producir virus es de $<0.1\%$.^{46,47} En pacientes sin tratamiento esta cantidad es pequeña y sólo se hace

evidente cuando decae el número de células que producen la mayor parte del virus (células activadas).⁴⁸ En algunos pacientes se logran niveles de carga viral indetectable, y la cuenta de células T CD4+ es estable durante varios años. Este periodo puede durar entre 1 y 15 años aproximadamente. Sin embargo, en este periodo se observa una disminución de células T CD4+ por debajo de 200 cT CD4+/ μ l, el sistema inmune es incapaz de controlar la infección, y se dispara la carga viral, indicativo del inicio de la etapa tardía, además se presentan los primeros síntomas asociados al SIDA, por ejemplo, las enfermedades oportunistas aparecen al no encontrar una defensa adecuada. Cuando estas enfermedades no se controlan o tratan pueden conducir a la muerte del paciente (Fig. 5).

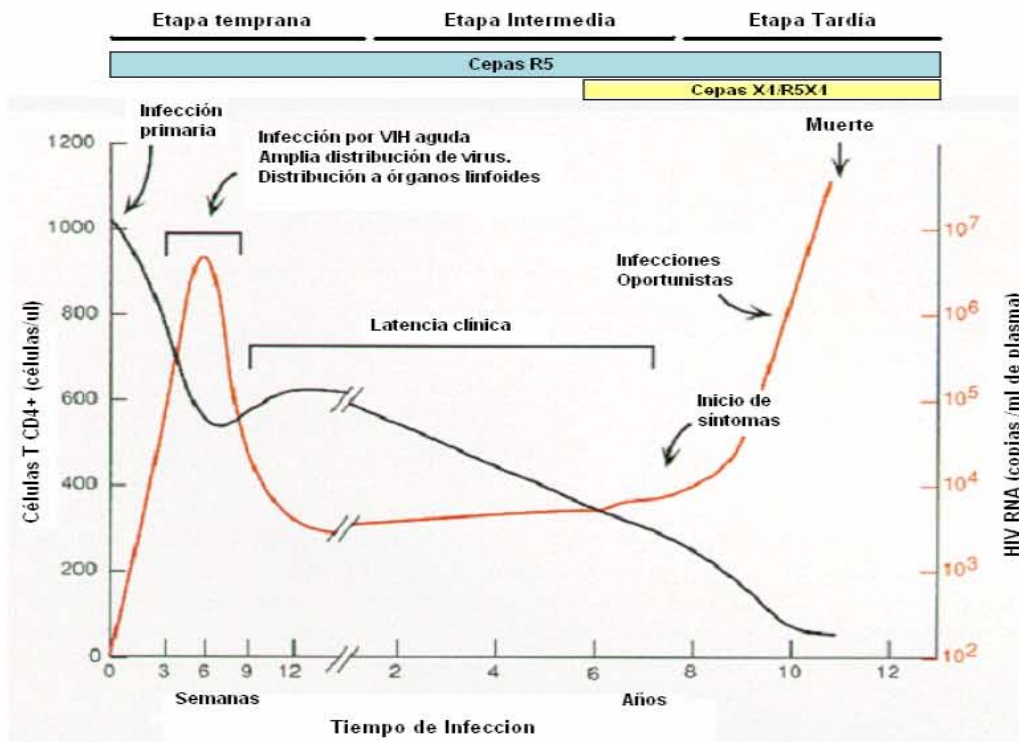


Figura 5. Curso de la infección por VIH. Patrones de disminución de células T CD4+, disminución de la carga viral plasmática, presencia y surgimiento de cepas virales. Al principio de la infección, la carga viral aumenta al no haber una respuesta inmune

adecuada las primeras semanas; a partir de esto, la respuesta inmune "controla" la infección equilibrando la tasa de producción/eliminación del virus, proceso que puede durar varios años, en un proceso de latencia. Finalmente el número de células linfocíticas desciende mientras que las tasas de producción viral aumenta, dejando al paciente expuesto a enfermedades oportunistas. Modificado de Pantaleo et.al. 1993.⁴⁹

Receptores y correceptores de VIH.

En el sistema inmune, el reconocimiento de antígenos por los linfocitos T CD4+ ocurre por la interacción del receptor de células T (TCR) y el complejo mayor de histocompatibilidad (MHC). Esta interacción se estabiliza por moléculas de membrana, tanto en la célula T como en la célula presentadora de antígeno (APC). Una de estas moléculas es CD4, una proteína de membrana de las células T que interactúa con las regiones polimórficas de MHC. Como respuesta a esta interacción, se envían señales al núcleo, que inducen activación celular, síntesis de proteínas, secreción de citocinas y proliferación celular.⁵⁰

Desde que se reportó que existe una reducción en el número de linfocitos T CD4+ circulantes en sangre, se pensó en un mecanismo por el cual el VIH infectaba específicamente a este grupo celular. En 1984 se demostró que la molécula CD4, presente en linfocitos T, macrófagos-monocitos y células dendríticas es el receptor a través del cual el VIH reconoce a sus células blanco y las infecta. Se cultivaron células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donador sano junto con el virus. Antes y durante la infección *in vitro* se agregaron anticuerpos monoclonales que bloquean receptores para HLA-II y células T "natural killer" (TNK), así como para CD4. Los dos primeros no inhibieron

la infección, pero los anticuerpos que inhibieron los receptores para CD4 impidieron la infección por VIH.⁵¹ También se experimentó utilizando un virus quimera que expresaba las glicoproteínas de envoltura de diferentes líneas de VIH y se infectaron diversos tipos de células, siendo las que presentaban el receptor de superficie CD4 (la presencia de dicho receptor se probó con anticuerpos monoclonales) las más susceptibles a infección en las que el virus parecía ser más selectivo en el tipo de células que infectaba, limitándose a líneas celulares T.⁵² Con el uso de varios anticuerpos, algunos de ellos con capacidad de bloquear células que expresan el receptor CD4, se logra la reducción de infección por los diferentes grupos de virus. Esto llevó a la conclusión de que era el receptor CD4 el que estaba involucrado en la infección por VIH.

Inicialmente, se consideró a CD4 como único receptor del VIH, sin embargo se comprobó que algunas líneas celulares sin CD4+ permitían la infección a pesar de no poseer dicho receptor.⁵³ Esto sugería la existencia de algún correceptor involucrado en el proceso de infección.

La búsqueda del correceptor que permitía la infección por VIH rindió frutos en 1996, cuando se encontró el primer correceptor utilizado por el VIH.⁵⁴ Se trata de un miembro de la familia de las proteínas G, con siete dominios transmembranales que pertenece al grupo de los receptores de quimiocinas, una familia de citocinas, que son mediadoras importantes de la comunicación entre células del sistema inmune y encargadas de reacciones inmunitarias e inflamatorias. Estas moléculas estimulan el movimiento de leucocitos y regulan su migración desde la sangre a los tejidos.^{55,56}

Este correceptor fue llamado "fusina". Actualmente se conoce como CXCR4, pertenece a la familia de las α -quimiocinas CXC (nomenclatura basada en la posición relativa de dos cisteínas conservadas en la región amino-terminal, los receptores adquieren la misma nomenclatura)⁵⁷ entre las que se encuentran SDF-1 α y SDF-1 β , que se han descrito como inhibidores de la infección por virus linfotrópicos *in vitro*⁵⁸ (Tabla 2). Se sabe que CXCR4 es el responsable de la unión de gp120 y la consecuente fusión de membranas observada en virus linfotrópicos.⁵⁹

El descubrimiento de este correceptor marcó la pauta para la búsqueda del resto de los correceptores que explicarían la infección de células que no poseían CXCR4, como es el caso de los macrófagos y las células de la microglía cerebral.

Otro paso importante en la búsqueda de los correceptores y en la comprensión de los mecanismos naturales mediante los cuales el organismo controla la infección, fue cuando se demostró que las β -quimiocinas CC (nomenclatura basada en la posición relativa de dos cisteínas conservadas en la región amino-terminal)⁶⁰ RANTES, MIP-1 α y MIP-1 β (Tabla 1) son factores importantes de supresión de VIH *in vitro* liberados por células T CD8+⁶¹, pero sólo en virus con afinidad hacia macrófagos (macrofagotrópicos) y no hacia linfocitos T (linfotrópicos). Siguiendo la pista de los descubrimientos de los factores de supresión liberados por las células CD8+ (RANTES, MIP- α y MIP-1 β) se descubrió el correceptor que permite la infección en macrófagos. En estudios de activación y de pérdida de función usando agentes que bloquean CCR5^{62,63}, (quimiocinas

en particular), se llegó a la conclusión de que este receptor de β -quimiocinas, es correceptor de las cepas virales con tropismo hacia macrófagos.

Tabla 2. Receptores de α y β -quimiocinas y sus ligandos. Encontramos a los receptores principales para R5 y X4, los dos principales fenotipos de VIH y sus respectivos ligandos, que han sido utilizados para bloquear la infección *in vivo* y descubrir y estudiar la interacción virus célula con los receptores de quimiocinas.

	Receptor	Nombre	Ligando
Alfa	CXCR-1	IL-8 RA	IL-8
	CXCR-2	IL-8 RB	IL-8GRO..... ENA-78NAP-2
	CXCR-3	IP-10/MIG R	IP-10MIG
	CXCR-4	Fusina	SDF-1•/PBSF, SDF-1•
	CCR1	MIP-1•/RANTES R	MIP-1a•••MCP3, RANTES, MCP-1
Beta	CCR2A	MCP-1 R•	MCP-1, -3
	CCR2B	MCP-1 R•	MCP-1, -3
	CCR3		EotaxinRANTESMCP-3
	CCR4		MIP1•RANTESMCP-1
	CCR5		MIP-1•••••RANTES

Se ha descrito una mutación de 32 pares de bases (CCR5 Δ 32) en el gen que codifica para el correceptor CCR5, que le confiere resistencia a la infección en individuos expuestos al VIH, y que es responsable de la evolución lenta en algunos sujetos infectados por VIH.⁶⁴ La presencia de esta mutación impide que CCR5 interactúe con la proteína viral gp120, lo que resulta en una disminución de la capacidad de infección del virus. Se pensó que esta mutación podía ser un factor protector, aunque se estima que sólo el 1% de la población caucásica la posee (es menor la proporción en el resto de los grupos étnicos) pero posteriormente se reportaron casos de infección en personas con la mutación, lo cual

se atribuyó a que diferentes cepas virales pudieran utilizar otro tipo de correceptores. Éste es el caso de las cepas que tienen tropismo hacia linfocitos o un tropismo dual, pudiendo infectar tanto macrófagos como linfocitos.

El virus puede utilizar otros correceptores, tales como los receptores de quimiocinas CCR2b, CCR3, CCR8, CCR9 y los receptores STRL33/Bonzo, GPR15/BOB y Apj, pero se ha comprobado que CCR5 y CXCR4 son los principales correceptores^{65,66} de fenotipos virales macrofagotrópicos y linfotrópicos respectivamente, mientras que se reporta la ausencia de actividad como receptor del virus para CCR1, CCR4, CCR6 y cualquier otro receptor CXC que no sea CXCR4.^{67,68}

Más que el propio receptor CD4, es el correceptor el que determina el tipo de virus y célula que establecerá la relación de infección, aunque se ha reportado que la utilización de CD4 soluble a altas concentraciones inhibe la infección de células TCD4+ *in vitro*.⁶⁹

Fenotipos del VIH.

El VIH se ha dividido en tres grupos de acuerdo a su fenotipo, por el tipo de correceptor que utiliza y las características que esto confiere a la infección, como citopatogenicidad y repercusiones en el curso de la enfermedad (Fig. 5).

Los virus R5 utilizan principalmente el correceptor CCR5, infectan células mononucleares y macrófagos, por lo que se les conoce como macrófagotrópicos. Se presentan durante todo el curso de la enfermedad, están asociados con progresión lenta y establecen las primeras etapas de la infección en el caso de la transmisión por

vía sexual, que es una de las principales vías de infección, debido a que las mucosas del tracto vaginal, anal e intestinal presentan numerosas células con receptor CCR5 y son blanco fácil para las cepas de virus que emplean este correceptor, siendo en esta zona donde se establece normalmente la infección primaria.⁷⁰ Las cepas que emplean este correceptor, tienen un fenotipo no inductor de sincicios (NIS) en cultivos *in vitro* de células MT-2 (línea celular linfocítica), es decir no inducen la fusión membranal de al menos 5 células que resulta en un efecto altamente citopático.

Los virus X4 utilizan principalmente el correceptor CXCR4 e infectan linfocitos T CD4+ *in vitro*, por lo que se les define como líneas linfotrópicas. Se presentan en la etapa tardía de la enfermedad (aunque a veces antes) poco antes de entrar a la etapa de SIDA. Las cepas X4 son más citopáticas que R5, están asociadas con la progresión rápida de la enfermedad y se cree que están relacionadas con la transmisión entre usuarios de drogas intravenosas cuando aparecen en etapas tempranas. Son inhibidas *in vitro* por α -quimiocinas. Una característica exclusiva de este tipo de virus es que inducen la formación de sincicios (IS) en células MT-2 *in vitro*.

Y finalmente los virus R5X4 o duales, que utilizan ambos correceptores, pueden infectar una gama amplia de células más amplio, pero por razones desconocidas aún, no son muy comunes en el transcurso de la enfermedad, aunque cuando se presentan es en las etapas intermedia y tardía de la enfermedad, se relacionan con la progresión rápida, además son inhibidos *in vitro* por α y β quimiocinas (Tabla 3).

Tabla 3. Fenotipos biológicos de VIH. En esta tabla se comparan las características de los tres grandes tipos de VIH conocidos por su tropismo y uso de correceptores.

	R5	X4	R5X4
Correceptor principal	CCR5	CXCR4	CCR5 y CXCR4
Tropismo	Macrófagos/monocitos	Linfocitos T CD4+	Macrófagos/monocitos y linfocitos T CD4+
Inhibidores	β -quimiocinas	α -quimiocinas	α Y β -quimiocinas
Fenotipo	No inductor de sincicia (NIS)	Inductor de sincicia (IS)	Inductor de sincicia (IS)
Estadíos	Temprano e intermedio	Tardío	Intermedio y tardío
Rango de replicación en PBMC	Lento	Rápido	Rápido

La capacidad de los diferentes tipos virales de infectar algunas células dependiendo del tipo de correceptor que utilizan está determinada por las cinco regiones variables de la proteína gp120 denominadas V1-V5, que son las que entran en contacto directo con la superficie celular y que se encuentran intercaladas entre regiones conservadas designadas C1-C5. Aparentemente la región V3 es la que tiene un papel más importante en la determinación de la especificidad del correceptor utilizado, y por ende en el tropismo celular mostrado por cada tipo viral, pero se ha demostrado que se requieren también las regiones V1, V2 y C4.^{71,72}

Dada la importancia de los correceptores en la determinación del tropismo de VIH hacia un grupo celular determinado (fenotipo linfotrópico o macrofagotrópico) y los efectos en la progresión de la enfermedad, es justificable la búsqueda de la relación entre la

frecuencia de los fenotipos biológicos del virus y su papel en el curso y evolución de la enfermedad y estado clínico. Este dato sería útil en la planeación de estrategias de tratamientos dirigidos a las diferentes cepas virales en las diferentes etapas. Sin embargo, no todos los pacientes en etapas tardías de la enfermedad, presentan fenotipos inductores de sincicios y en muchas ocasiones se presentan muy tempranamente en el curso de la enfermedad. Por esto es importante determinar la frecuencia de los fenotipos inductores de sincicios en cada una de las etapas de la enfermedad en nuestra población y su relación con el estado clínico e inmunológico de los pacientes.

Dado que se ha descrito una evolución en el curso de la enfermedad de fenotipo no inductores hacia inductores de sincicios, se consideró la posibilidad de que hubiese una mayor frecuencia del fenotipo IS en el grupo de pacientes en etapa tardía. Si existe una mayor frecuencia de fenotipo IS en esta etapa, es posible que exista una mayor frecuencia de enfermedades oportunistas y síntomas relacionados a SIDA. Para tratar de establecer esto se buscó definir específicamente qué enfermedades podrían estar asociadas al fenotipo biológico.

Nuestro objetivo es determinar la frecuencia de los fenotipos biológicos del VIH en pacientes en etapas intermedias y tardía de la enfermedad, clasificados con base en su cuenta de células T CD4+ y determinar si existe mayor frecuencia de infecciones oportunistas en pacientes con fenotipos biológicos inductores y no inductores de sincicios.

Si existe una mayor frecuencia de fenotipo IS en la etapa tardía, es posible que exista una relación con

enfermedades y síntomas relacionados con SIDA en este grupo. Se buscó definir específicamente qué condiciones (enfermedades oportunistas específicamente en este caso) podrían estar asociadas con el fenotipo biológico.

1 Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W & Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). Science 220: 868-871.

-
- 2 Rey MA, Spire B, Dormont D, Barre-Sinoussi, F. Montagnier, L. Chermann, J.C. 1984. Characterization of the RNA dependent DNA polymerase of a new human T-lymphotropic retrovirus (lymphadenopathy associated virus). *Biochem Biophys. Res. Commun*, 121 (1): 126-133.
- 3 Coffin JM, Hughes SH, Varnus HE, *Retroviruses: Pathogenesis of HIV and SIV* National Centre of Biotechnology Information
- 4 Gartner L. P. & Hiatt J. L. *Texto Atlas de Histología*, McGraw Hill, 2001. pp 263.
- 5 Coffin JM, Hughes SH, Varnus HE, *Retroviruses: Pathogenesis of HIV and SIV* National Centre of Biotechnology Information
- 6 Rosenberg Z.F. Fauci A. S. 1989, The immunopathogenesis of HIV infection. *Adv. Immunol.* 47: 377-431.
- 7 Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W & Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
- 8 Gottlieb, M.S. Schanker, H.M. Fan, P.T. Saxson, A. & Weisman J.D. 1981, Mortality and Morbidity Week Report. 30 (21): 1-3.
- 9 ONUSIDA. Situación de la epidemia de SIDA: Diciembre de 2006.
- 10 SSA, Dirección General de Epidemiología, Registro Nacional de Casos de SIDA, 2006.
- 11 ONUSIDA. Situación de la epidemia de SIDA: Diciembre de 2006.
- 12 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain. capítulo 20.
- 13 Berger EA, Murphy PM & Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism and disease. *Annual Review of Immunology* 17:657-700.
- 14 Dimitrov, D.S. Cell biology of virus entry. *Cell* 2000, 101: 697-702.
- 15 Coffin, J.M. Hughes, S.H. Varnus, H. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1998.
- 16 Hope, T.J. Trono, D. Structure, 2002 Expression and regulation of the HIV genome. De: HIV InSite Knowledge Base Chapter.
- 17 Hope, T.J. Trono, D. 2002 Structure, expression and regulation of the HIV genome. De: HIV InSite Knowledge Base Chapter.
- ¹⁸ Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain.
- 19 Hope, T.J. Trono, D. Structure, 2002 Expression and regulation of the HIV genome. De: HIV InSite Knowledge Base Chapter.
- 20 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain. p.p. 473.

-
- 21 Earl P.L. Doms, R.W. Moss, B. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87:648-652.
- 22 Brelot A. Alizon M. HIV-1 entry and how to block it, *AIDS* 2001, 15 (suppl 5): s3-s11.
- 23 Ugolini, S. Mondor, I. Sattentau Q.J. HIV-1 attachment; another look, *Trends Microbiol*, 1999, 7:144-149.
- 24 Blair, W.S. Lin, P.F. Meanwell, N.a. Wallace, O.B. HIV-1 entry, an expanding portal for drug discovery, *Drug Discovery Today*, 2000, 5:183-194.
- 25 Monck, J.R. Fernández, J.M. The fusion pore and mechanism of biological membrane fusion, *Curr Opin Cell Biology*, 1996, 8: 524-533.
- 26 Kliger Y, Gallo S.A. Peisajovich S.G. et al, Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1. Inhibition at a post-lipid mixing stage. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276:1391-1397.
- 27 Kilby JM, Eron JJ. 2003. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. *The New England Journal of Medicine* 348: 2228-38
- 28 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain. p.p. 475.
- 29 Haase, A.T. Population Biology of HIV-1 Infection: Viral and CD4+ T Cell Demographics and Dynamics in Lymphatic Tissues. *Ann. Rev. Immunol.* 1999; 17:625-656.
- 30 Chun, T.W. et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. *Nature*, 1997: 387; 187-188.
- 31 Pessler, F. Cron, R.Q. Reciprocal regulation of the nuclear factor of activated T cells and HIV-1, *Genes and Immunity*, 2004; 5:158-167.
- 32 Abbas, A.K. *Ibid.* 184-185.
- 33 Hope, T.J. Trono, D. 2002 Structure, expression and regulation of the HIV genome. De: HIV InSite Knowledge Base Chapter.
- 34 Andreas Manns, Herbert König, Michael Baierl, Reinhard Kurthl and Frank Grosse, Fidelity of reverse transcriptase of the simian immunodeficiency virus from African green monkey, *Nucleic Acids Research*, 1991, Vol. 19, No. 3 533-38.
- 35 Simon V., Ho D.D., 2003, HIV-1 dynamics in vivo: Implications for therapy. *Nature Review of Microbiology*, 1: 181-190.
- 36 Simon V., Ho D.D., 2003, HIV-1 dynamics in vivo: Implications for therapy. *Nature Review of Microbiology*, 1: 181-190.
- 37 Finzi D. and Siliciano
- 38 Joseph J. Mattapallil, Daniel C. Douek, Brenna Hill, Yoshiaki Nishimura, Malcolm Martin & Mario Roederer, 2005, Massive infection and loss of memory CD4 + T cells in multiple tissues during acute SIV infection, *Nature*, Vol 434, pp 1903-7.

-
- 39 Zack, J.A., Arrigo, S.J., Weitsman, S.R., Go, A.S., Haislip, A., and Chen, I.S.Y. (1990). HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61, 213-222.
- 40 Bukrinsky, M.I., Sharova, N., Dempsey, M.P., Stanwick, T.L., Bukrin- lar dendritic cells and human immunodeficiency virus infectivity. skaya, A.G., Haggerty, S., and Stevenson, M. (1992). Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration com-plexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6580-6584.
- 41 Spina, C.A., Guatelli, J.C., and Richman, D.D. (1995). Establishment of a stable, inducible form of human immunodeficiency virus type 1 DNA in quiescent CD4 lymphocytes in vitro. *J. Virol.* 69, 2977-2988.
- 42
- 43 Zhang, Z.Q. et al. Sexual transmiión and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*. 1999; 286:1353-1357.
- 44 Abbas A.K. *ibid.* p.p. 482.
- 45 Perelson, A.S., Essunger, P., and Ho, D.D. (1997b). Dynamics of HIV-1 and CD4 • lymphocytes in vivo. *AIDS* 11 (Suppl. A), S17-S34.
- 46 Bukrinsky, M.I., Stanwick, T.L., Dempsey, M.P., and Stevenson, M. (1991). Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 254, 423-427.
- 47 Chun, T.-W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., Digiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., et al. (1997a). Quantitation of latent tissue reservoirs and total body load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-188.
- 48 Chun, T.-W., Carruth, L., Finzi, D., Shen, X., Digiuseppe, J.A., Taylor, H., Hermankova, M., Chadwick, K., Margolick, J., Quinn, T.C., et al. (1997a). Quantitation of latent tissue reservoirs and total body load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-188.
- 49 Pantaleo, G. Graziosi, C. Fauci, A.S. 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med.* 328: 327-335
- 50 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. *Ibid.*
- 51 Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruet J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. 1984. T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312: 767-768.
- '52 Dalgleish AG, Beverly PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. 1984. The CD4 (T4) antigen in an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-766
- 53 Clapman, P.R., McNight, A., Weiss, R.A., 1992, Human immunodeficiency virus type 2 infection and fusion of CD4-negative human cell lines: induction and enhancement with soluble CD4. *Journal of Virology* 66:3531-3537.

-
- 54 Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. 1996. HIV entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-77.
- 55 Abbas AK, *ibid*.
- 56 Gartner L. P. & Hiatt J. L. *Ibid*.
- ⁵⁷ Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacology Review* 2000, 52:145-176.
- ⁵⁸ Oberlin E, Amara A, Bachelier F. 1996, The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection of T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382:833-835.
- ⁵⁹ Michael, N.L., Nelson, J.A., KewalRamani, V.N. 1998, Exclusive and persistent use of the entry coreceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta 32. *Journal of Virology*, 72: 6040-6047.
- ⁶⁰ Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacology Review* 2000, 52:145-176.
- ⁶¹ Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P, 1995, Identification of RANTES, MIP- α & MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells, *Science* 270:1811-1815.
- 62 Deng HK, Lui R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-66
- 63 Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-58
- ⁶⁴ Samson M, Libert F, Doranz BJ, 1996, Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene, *Nature* 382: 722-725.
- ⁶⁵ Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR, 1997, Change in coreceptor usage correlates with disease progression in HIV-1-infected individuals. *J, Exp? Med* Vol 185, No 4: 621-627.
- ⁶⁶ Samson M, *et. al.* 1996.
- ⁶⁷ Michael NL, *et. al.* 1998.
- 68 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain.
- 69 Hoxie JA, LaBranche CC, Endres MJ, *et al.* 1998. CD4-independent utilization of the CXCR4 chemokine receptor by HIV-1 and HIV-2. *J Reprod Immunology* 41:197-211.
- 70 Joseph J. Mattapallil, Daniel C. Douek, Brenna Hill, Yoshiaki Nishimura, Malcolm Martin & Mario Roederer, 2005, Massive infection and loss of memory CD4 + T cells in multiple tissues during acute SIV infection, *Nature*, Vol 434, pp 1903-7.
- 71 Berger EA, Murphy PM & Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism and disease. *Annual Review of Immunology* 17:657-700.

⁷² Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P, 1996, The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 2: 1244-1247.

MÉTODOS

Se seleccionaron muestras de plasma de 95 pacientes del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CIENI) del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) quienes al momento de la toma de muestra no habían iniciado tratamiento antirretroviral, y contaban con determinaciones de carga viral plasmática (Cobas Amplicor, Roche) y conteo de linfocitos T CD4+ (Tritest, Becton Dickinson).

Los pacientes fueron clasificados en dos grupos con base en el conteo de células T CD4+. Para la etapa intermedia se tomaron en cuenta a los pacientes con niveles de células T CD4+ mayores a 200 células/ μ l. Los pacientes en etapa tardía deberían tener <200 células/ μ l. El Centro de Control de Enfermedades⁷¹ (CDC por sus siglas en inglés) y la Organización Mundial de la Salud (OMS)⁷² establece que las condiciones o enfermedades definitorias de SIDA aparecen en individuos con menos de 200 cT CD4+/ μ l, y con base en esto se establecieron los dos grupos de estudio.

Se aislaron los virus mediante cultivo de plasma en células mononucleares de sangre periférica (CMSP) de donador VIH negativo activadas. Se determinó la replicación de VIH en estos cultivos por producción de nuevos viriones mediante la técnica de ELISA para Agp24 de VIH (Beckman Coulter). En los pacientes cuyas muestras de plasma resultaron negativas, se obtuvo el aislamiento viral a partir de cultivos de células sin linfocitos T CD8+ (que inhiben la replicación de VIH *in vitro*), verificados por citometría.

A todos los cultivos positivos se les realizó el ensayo de fenotipo biológico de VIH mediante la técnica de cultivo de células MT-2.

Separación de CMSP de donador VIH negativo.

A partir de un paquete de concentrado leucocitario obtenido del Banco de Sangre del Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER), de donador VIH negativo, se purificaron las células mononucleares (CMSP). Se diluyó la sangre en proporción 1:2 con solución balanceada de Hank's (HBSS) a 37°C. Se preparó el gradiente celular por densidad colocando 10 ml de Lymphoprep (ficoll, solución de polisucrosa, densidad = 1.77 g/ml. Axis-Shield) en tubos de 50 ml. y cuidadosamente, evitando mezclar, se estratificaron 30 ml. de la sangre diluída, se centrifugó a 2000 rpm durante 20 minutos. Recuperamos la capa conteniendo las células que se distingue entre el medio HBSS (rojo) y el lymphoprep (transparente), y resuspendimos en un tubo con 30 ml. de HBSS. Realizamos 3 lavados con 30 ml de medio HBSS, a 37°C, centrifugando a 1500 rpm durante 10 min. descartando el sobrenadante después de cada lavado. Finalmente se contó en cámara de Neubauer el número de CMSP obtenidas, y se colocaron en el medio requerido o se congelaron en caso de no utilizarse en el momento.

Congelación.

Se preparó medio de congelación con 90% de Suero Bovino Fetal (SBF) y 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) dejando enfriar a 4°C, hasta el momento de su uso. Contamos las células para congelar entre 2.5×10^6 y 3×10^6 células

de paciente en volumen final de 1.5 ml de medio de congelación en cada criovial. Se centrifugaron las células, eliminando el sobrenadante y se resuspendieron en el volumen de medio de congelación apropiado para colocarlos rápidamente en cajas de unicel a -80°C . Al día siguiente se guardaron las muestras en nitrógeno líquido.

Descongelación.

Se retiraron los tubos del tanque con nitrógeno líquido y se colocaron inmediatamente en baño de agua a 37°C . Se utilizaron entre 10 y 20 ml de medio HUT (compuesto de RPMI 1640, 10% de Suero Bovino Fetal, 100 unidades/ml de estreptomycin/penicilina y 20 unidades de L-glutamina) por cada muestra descongelada de paciente (de 2 a 3 viales). Colocamos las células en el medio HUT precalentado a 37°C y resuspendimos rápidamente, se lavaron las células 3 veces con 30 ml de medio HUT y se contaron. Se incubaron toda la noche (ó 6 horas como mínimo) a 37°C , con 5% de CO_2 y 85% de humedad, y se lavaron una vez más al día siguiente, se resuspendieron en el medio requerido.

Cultivo de VIH a partir de plasma con heparina.

Tres días antes del cultivo, se estimularon CMSP de donador VIH negativo con fitohemaglutinina (PHA-P, lectina) a 3 $\mu\text{g/ml}$, en medio IL-2 al 5%. El día del cultivo, se lavaron las células 3 veces con 30 ml de HBSS, centrifugando a 1500 rpm durante 10 min y se contaron, se resuspendieron 3×10^6 células/ml en medio IL-2 al 5%, para incubar con 2 $\mu\text{g/mL}$ de polibreno,

durante 30 minutos a 37°C y centrifugamos 5 min a 1500 rpm. Resuspendimos las células en medio IL-2 al 5%, a 10×10^6 células/mL. Colocamos 3×10^6 células por pozo (300 μ L), en placa de 24 pozos, por triplicado. Se descongeló el plasma y realizaron diluciones 1:2 y 1:4, colocando 400 μ L de plasma sin diluir y de cada una de las diluciones en cada uno de los pozos marcados. Se incubaron los cultivos toda la noche a 37°C, con 5% de CO₂ y 85% de humedad. Al día siguiente, se aspiraron 500 μ L de cada sobrenadante, evitando acarrear células y se desecharon. Se transfirió el contenido de cada pozo a un frasco T-25 y se agregaron 4 mL de medio conteniendo IL-2 al 5% para incubar los cultivos a 37°C, con 5% de CO₂ y 85% de humedad.

Se recolectaron 3.5 mL de sobrenadante de cada frasco, a los 4, 7, 10, 14, 18 y 21 días de cultivo y agregamos 4 ml de medio conteniendo IL-2 5%. Los cultivos se alimentaron con 3×10^6 CMSP de donador VIH negativo los días 7 y 14. Se congelaron 4 alícuotas (3 con 1000 μ l y una con 500 μ l). Medimos agp24 los días 7, 14 y 21 de cultivo.

Ensayo de Ag p24 del VIH de COULTER *in vitro* Diagnosticum.

Se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. En resumen, se colocaron 200 μ l de sobrenadante de cultivo, controles negativos y positivos en placas de ELISA que contenían anticuerpos anti-p24 de VIH unidos, se adicionó un tampón de lisis para romper los viriones y se incubó a 37°C, con 5% de CO₂ y 85% de humedad, durante 1 hora. Se realizó un lavado con amortiguador, y

se colocaronn 200 μ l de un segundo anticuerpo anti-p24 de VIH acoplado a biotina, que se une a los antígenos unidos a la placa. Se realizó un segundo lavado con amortiguador para eliminar excedentes y se adicionaron 200 μ l de estreptavidina conjugada con peroxidasa de rábano que se incubó durante 30 minutos a 37°C, con 5% de CO₂ y 85% de humedad. Se realizó un tercer lavado con amortiguador, adicionamos 200 μ l de sustrato tetrametilbencidina (TMB), e incubamos a temperatura ambiente durante 30 min. Se agregaron 50 μ l de solución de paro (H₂SO₄ 4N) a cada pozo para detener la reacción. Se leyó en espectrofotómetro a una longitud de onda dual de 450/570 nm, estableciendo el punto de lectura con la siguiente fórmula: 2X (control negativo) + 0.050 + 4 SD (control negativo) donde:

- 2X = dos veces, la media del control negativo.
- 0.050 = constante.
- 4 SD = 4 veces la desviación estándar del control negativo.

Separación de células T CD8+ de paciente.

Se descongelaron y contaron las CMSP de los pacientes, se incubaron a 24 horas en medio HUT a 37°C, con 5% de CO₂ y 85% de humedad. Se colocaron las células en medio conteniendo IL-2 al 5% por otras 24 horas contando las células obtenidas para poder calcular el número de esferas anti-CD8 requeridas, mediante la siguiente fórmula:

Esferas anti-CD8(ml): (Millones de CMSP) (0.50) (1.5) / 140, donde:

- 0.50 = Relación de células T CD4+ esperadas.
- 1.5 = Relación óptima de CD4+ - esferas.

- 140 = Concentración de esferas por ml en el vial.

Se lavaron las esferas anti-CD8+ 3 veces con 5 ml de PBS-SBF 2% a 4°C, posteriormente se resuspendieron a una concentración de 10×10^6 esferas/ml. Mezclamos las CMSP y las esferas anti-CD8+ en el rotador (Dynal), a 4°C por 45 minutos. Se separaron las células T CD8+ unidas a las esferas, magnetizando y recuperando el sobrenadante con pipeta de 5 ml. Colocamos el sobrenadante libre de cT CD8+ en un tubo de 15 ml con 5 ml de medio con IL-2 10% y centrifugamos durante 10 minutos a 1500 rpm para resuspender en frasco a 3×10^6 /ml de IL-2 10%. Se determinó la cantidad de células T CD8+ remanentes en la muestra mediante citometría de flujo.

Determinación de pureza por citometría de flujo.

Para determinar la eficiencia del método de separación de células T CD8+ se midió la pureza a través de citometría de flujo.

Se tomó una alícuota de entre 1 y 2×10^6 CMSP por cada tinción, el volumen lo determinó la cantidad de medio en que estaban suspendidas. Se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm. Agregamos 10 μ l del reactivo Tritest de Becton Dickinson, que contiene anticuerpos anti-CD4 marcados con isotiocianato de fluoriceina (FITC), anti-CD8 marcado con ficoeritrina (PE) y anti-CD3 marcados con proteína clorofil peridinina (PerCP) e incubamos 20 minutos en hielo. Se lavaron con PBS-SBF 2% (3 ml) y centrifugaron a 1500 rpm por 5 minutos. Se descartó el sobrenadante y resuspendieron en 0.5 ml de PBS.

Opcionalmente se pueden resuspender en formaldehído al 3% en PBS de preparación reciente y guardar a 4 °C hasta su lectura, durante un periodo no mayor a 24 horas.

Se leyó en citómetro de flujo (FACScan, Becton Dickinson) utilizando el programa de Cell Quest. Los parámetros para establecer las poblaciones de linfocitos fueron forward scatter y side scatter. Se hicieron ventanas para parámetros CD3-CD4, CD3-CD8 y CD4-CD8.

Cultivo de VIH a partir de CMSP de paciente sin cT CD8+.

Se utilizaron 3×10^6 CMSP activadas de paciente sin células T CD8+, y 3×10^6 células CMSP P1 de donador sano, estimuladas por 3 días con PHA-L en medio IL-2 (5%). Lavamos las células P1 3 veces con 30 ml de medio HBSS a 37°C, centrifugando a 1500 rpm por 10 minutos, y se contaron para ser resuspendidas en medio IL-2 al 5% a 37°C en una proporción de 3×10^6 células/ml. Se contaron las células del paciente y centrifugamos 10 minutos a 1500 rpm. Colocamos 3×10^6 CMSP de los pacientes en un frasco de cultivo junto con 3×10^6 P1 de donador (VIH negativo) en 4 ml de medio IL-2 al 5% a 37°C, se recolectaron sobrenadantes (aprox 500µl) los días 4, 7, 10, 14, 17 y 21 de cultivo, y se alimentaron los cultivos con células P1 (de donadores VIH negativos) los días 7 y 14 del cultivo, y con medio IL-2 al 5%. Centrifugamos los sobrenadantes y congelamos al menos 3 alícuotas.

Ensayo de fenotipo biológico en células MT-2.

Para determinar el fenotipo biológico de aislados primarios de VIH (con no más de 3 pases con CMSP) y

evaluar el efecto citopático de dichos aislados, se utilizó la línea celular MT-2 (con una viabilidad mayor a 90%). Se infectaron las células con sobrenadantes de cultivos positivos. La producción (replicación) del virus se midió mediante la detección de Agp24 o actividad de transcriptasa inversa en los sobrenadantes de los cultivos de MT-2, que son linfocitos T humanos aislados de linfocitos de sangre de cordón umbilical, células inmortalizadas que contienen en su genoma el virus HTLV-T2 no defectuoso (virus de la leucemia humana de células T) que son capaces de ser infectadas por VIH cuando es capaz de utilizar el correceptor CCR5ⁱ, formando sincicios. Se colocaron 1×10^6 células MT-2 por pozo en medio HUT en placas de 24 pozos y se añadió a cada pozo por duplicado 500 μ l de sobrenadante de cultivo de virus de los pacientes (aislado primario), dejando incubar toda la noche a 37 °C, 5% de CO₂ y 85% de humedad.

Se cambió el medio cada 2 días y examinamos las placas diariamente a partir del día 2 para identificar la presencia de sincicios (efecto citopático).

Según protocolos previos, se utilizaron los siguientes controles:

- Control negativo primario: VIH SF162 (Macrófago trópico, no inductor de sincicios).
- Control positivo: VIH SF33 (Linfotrópico, inductor de sincicios) Induce la formación de sincicios en las primeras 48-72 horas.

Los criterios que definen un sincicio son células multinucleadas, con diámetro mayor a 5 diámetros de células normales determinados por microscopía.

Análisis clínicos.

Para confirmar la relación entre la etapa de la enfermedad, el fenotipo y las infecciones oportunistas se revisaron los expedientes clínicos de los pacientes cuyas muestras dieron resultados positivos para VIH en la prueba de Elisa y tenían ya una prueba de fenotipo biológico a través del cultivo con células MT-2. Los datos clínicos fueron obtenidos revisando el expediente clínico de cada uno de los pacientes, registrando cada uno de los eventos contenidos en este (enfermedades, malignidades e infecciones) así como la fecha de diagnóstico. Esto incluye reportes de laboratorios clínico, patológico, microbiología, reportes de cirugía y revisiones médicas.

Estadística.

Para establecer las diferencias entre los valores de variables continuas (conteo de cT CD4+, CV, edad) entre dos grupos, se utilizó la prueba de *t* no pareada.

Se empleó la prueba de Chi^2 para determinar si existe diferencia en las frecuencias de una variable categórica entre dos grupos, es decir los fenotipos. Se tomaron valores de *p* significativos < 0.05.

ⁱ NIH AIDS Research & Reference Reagent Program. 2007.

RESULTADOS

Estado Basal.

Se seleccionaron 95 pacientes con infección documentada por VIH del Centro de Investigación de Enfermedades Infecciosas (CIENI) en el Instituto Nacional de Enfermedades Respiratorias (INER) de los cuales se tenían muestras de plasma y que no hubieran llevado tratamiento antirretroviral anterior a la toma de ésta, de los cuales 45 se encontraban en etapa intermedia de la enfermedad y 50 en etapa tardía. Dicha selección se hizo con base en su cuenta de células T CD4+ circulantes, >200 células/ μ l y <200 células/ μ l respectivamente.

Las muestras utilizadas, tanto de plasma como de células de los pacientes fueron tomadas entre julio del 2001 y diciembre del 2004.

De los 95 pacientes seleccionados solo se logró aislar el VIH en cultivo de las muestras de 74 pacientes, 30 de etapa intermedia y 44 de tardía. Los resultados mostrados son los obtenidos de pacientes cuyas muestras resultaron positivas (Tabla 4).

En un primer ensayo de cultivos a partir de muestras de plasma de paciente, solamente se obtuvieron 42 resultados positivos (Tabla 5) por lo que se recurrió a las células mononucleares de sangre periférica.

Tabla 4. Datos basales de los pacientes con resultados de fenotipo biológico considerados en el estudio. Criterios de clasificación y datos demográficos. Se utilizó prueba de t no pareada para establecer diferencias entre dos grupos.

	Etapa intermedia	Etapa tardía	P
--	------------------	--------------	---

N	30	44	
Cuenta de cT CD4+/ μ l \pm DE	434.6 \pm 171.2	59.5 \pm 39.86	<0.0001
Carga viral (copias de ARN-VIH/ml) \pm DE	120,837 \pm 161,399	784,363 \pm 803,300	<0.0001
Log Carga Viral (Log copias de ARN-VIH/ml) \pm DE	4.62 \pm 0.76	5.61 \pm 0.58	<0.0001
Edad (años \pm DE)	33.83 \pm 8.7	34.9 \pm 6.6	0.57*
Sexo (masculino)	27 (90%)	39 (88.6%)	0.999*

*no significativa

De los aislados primarios a partir de plasma, se observó una mayor frecuencia de cultivos positivos para VIH en los cultivos de pacientes en etapa tardía (Tabla 5, *t* no pareada, *p* <0.0001).

Tabla 5. Porcentaje de cultivos positivos a partir de plasma.

	Etapa intermedia	Etapa tardía	Total
Positivos en plasma	7	35	42
Negativos en plasma	38	15	53
Porcentaje de positivos	7.36%	36.8%	44.16%

De los 53 pacientes cuyos cultivos en plasma resultaron negativos, se disponía de muestras de células mononucleares de sangre periférica sólo de 45 pacientes, 32 de etapa intermedia y 13 de etapa tardía. Las muestras de células de los restantes 8 pacientes no estaban disponibles, 6 de etapa intermedia y 2 de tardía.

Se separaron las células T CD8+ de las muestras de paciente, por medio de inmunoesferas específicas anti-CD8. Para comprobar la efectividad del método, se midieron los niveles de células T CD8+ por medio de citometría de flujo observándose una disminución significativa de células T CD8+ de una media de 33.8%

antes de la separación a 1.6% después de ella (prueba de t no pareada, $p < 0.001$, Fig. 6).



Fig 6. Ejemplo de determinación de células T CD8+ por citometría de flujo. En el cuadrante superior derecho se observa el porcentaje de células CD3+CD8+. A) PBMC antes de la separación. B) PBMC después de la separación, donde se puede observar la disminución del porcentaje de células CD3+CD8+.

Se procedió a realizar el cultivo de CMSP tanto de pacientes como de donadores VIH negativos. Se determinó antígeno p24 por medio del método de ELISA en sobrenadante, encontrándose 32 muestras positivas, 23 de ellas de pacientes en etapa intermedia y 9 de etapa tardía (Tabla 6).

Tabla 6. Frecuencia de cultivos positivos a partir de PBMC de paciente sin células T CD8+.

Después de realizar cultivos de plasma y de células, se contaba con muestras de virus de 74 pacientes; 30 de ellos de etapa intermedia y 44 de etapa tardía. Con dichas muestras se realizaron las pruebas de fenotipo biológico en células MT-2.

En cada ensayo de fenotipo se demostró la formación de sincicios tomando como referencia el virus utilizado como control positivo VIH_{SF33}. Al mismo tiempo, se demostró que el control negativo VIH_{SF162} no indujo

	Etapa intermedia	Etapa tardía	Total
Positivos en células	23	9	32
Negativos en células	9	4	13
Porcentaje de positivos	51.1%	20%	71.1%
No disponibles	6	2	8

formación de sincicios. Con el criterio de que un sincicio es la fusión de cinco o más células, se consideraron positivos aquellos cultivos que presentaran sincicios en los pozos por duplicado (Fig. 7)

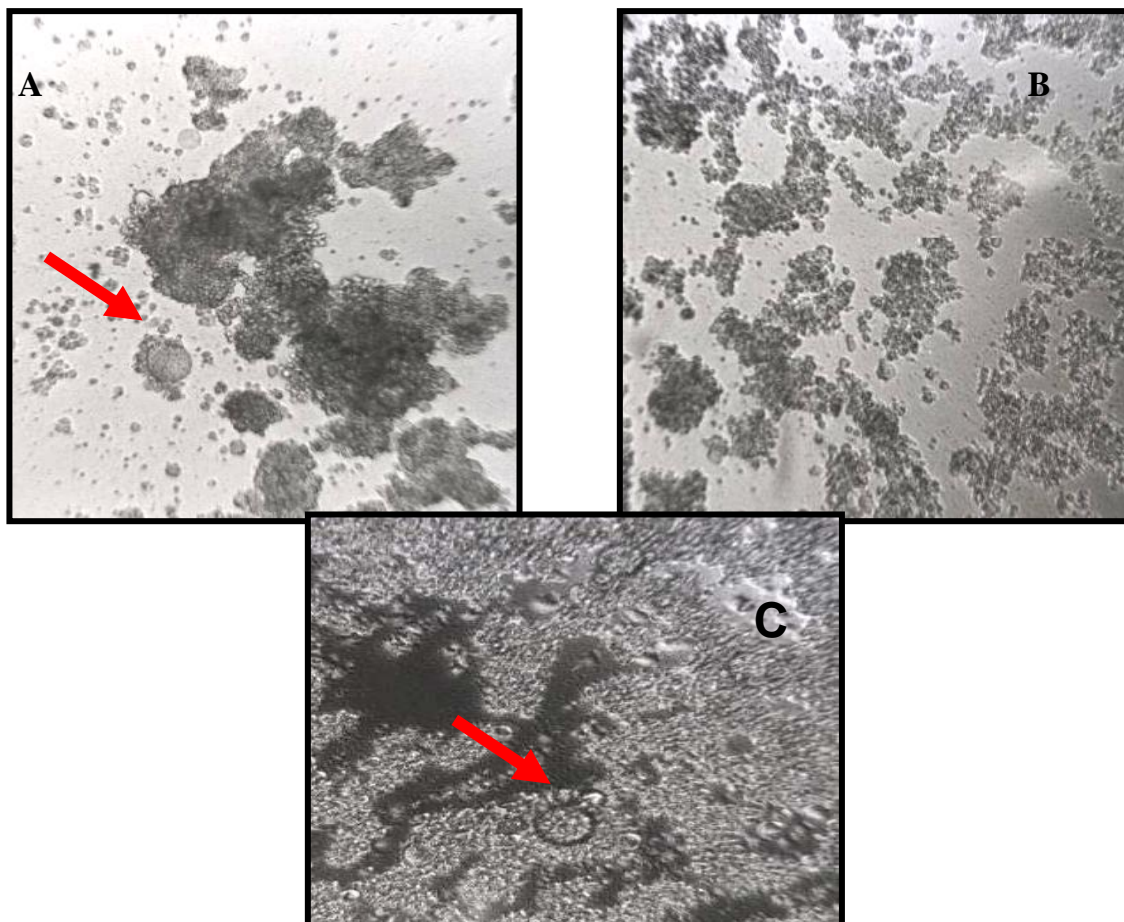


Fig 7. Imágenes de las pruebas de fenotipo en células MT-2. A. Formación de sincicios por virus control VIH_{SF33}. Se muestra un sincicio (flecha roja), formado por la fusión de células cuyo diámetro excede el de 5 células no infectadas; B. Fenotipo no inductor de sincicios en cultivo de paciente, no se observan células o grupo de células fusionadas; C. Cultivo de VIH de paciente con fenotipo inductor de sincicio con formación de sincicia (flecha roja).

En el grupo de pacientes en etapa intermedia, se encontró una frecuencia significativamente menor de fenotipos inductores de sincicios (1/30) que en el grupo de pacientes en etapa tardía (12/44, χ^2 p < 0.01, Fig. 8).

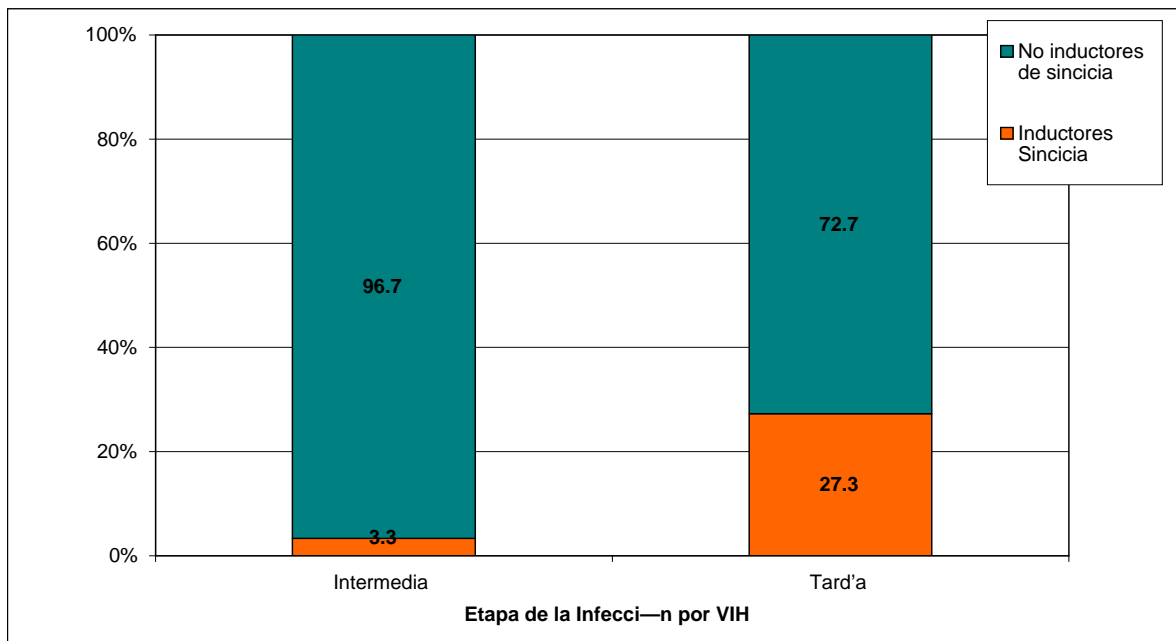


Figura 8. Porcentaje de fenotipos inductores y no inductores de sincicia en cada grupo de pacientes. En los pacientes de la etapa intermedia, no es tan marcada la aparición de fenotipos inductores de *sinctitia* que solo representaron el 3.3%, es decir, 1 de las 30 muestras disponibles, mientras que en los pacientes de etapa intermedia, las 12 muestras positivas de las 44 disponibles representan el 27.3% de dicho grupo. $\chi^2 = 7.059$, p $\chi^2 = 0.0079$, Valor p Fisher = 0.0109.

Al comparar los niveles de células T CD4+ y carga viral entre los fenotipos, podemos observar que existe una mayor asociación entre el fenotipo y los niveles de CD4+, es decir, los fenotipos IS están asociados a niveles menores de células T CD4+, mientras que la relación entre el fenotipo y la CV no es clara, dado que los grupos tuvieron niveles semejantes (Tabla 7).

Tabla 7. Asociación de los niveles de células T CD4+ y carga viral (CV) con los fenotipos biológicos de VIH. Prueba de *t* no pareada.

	NIS	IS	P
CD4+ \pm DE	241.09 \pm 224.9	73.7 \pm 86.58	0.01
CV \pm DE	5.1 \pm 0.8	5.5 \pm 0.8	0.11

Se revisaron los expedientes médicos para comprobar el estado clínico en el que se encontraban los pacientes. Del total de los 74 pacientes de los que se contaba ya con una determinación de fenotipo viral se tuvo acceso a 67 expedientes, 30 de etapa intermedia y 37 de tardía, mientras que los 7 restantes, todos de la etapa tardía no contaban con un expediente, de esos siete 2 tenían fenotipo inductor de sincicios y 5 no inductor. Tras la revisión se detectaron 6 enfermedades o condiciones reportadas más comunes (linfadenopatías, neumonía, tuberculosis, citomegalovirus (por IgG CMV), candidiasis y herpes) varias lesiones dermatológicas (fístulas, úlceras, pápulas, urticaria, orzuelo, condilomas, prurito y lesiones generalizadas) y otras enfermedades de menor prevalencia (SAOS, rubeola, faringitis, disfagia, meningitis, gonorrea, hepatitis, lipodistrofia, toxoplasma y criptococos).

Al comparar los grupos por etapas y las enfermedades, se observa que la neumonía y la candidiasis oral presentaron una diferencia significativa con mayor

prevalencia en la etapa tardía con respecto a la intermedia, a diferencia de la adenomegalia y otras enfermedades que tuvieron una diferencia significativa mayor en etapa intermedia que en la tardía. Para TB y Mac solo se observó una tendencia en etapa tardía. No observamos diferencias en la presencia de CMV, herpes y lesiones dermatológicas (Fig. 9).

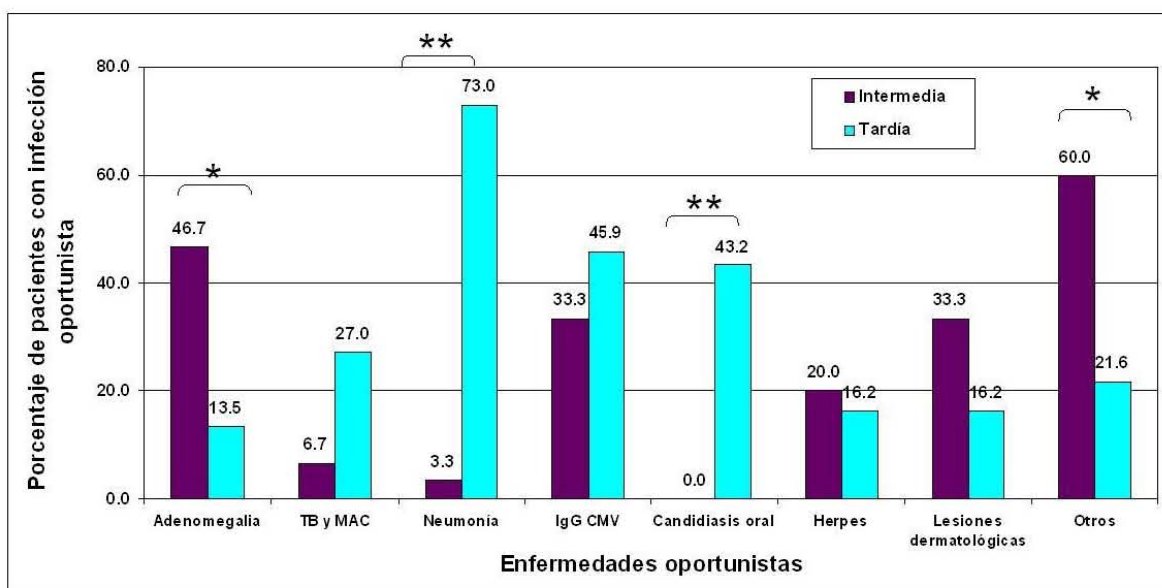


Figura 9. Podemos ver las enfermedades que predominan en cada una de las etapas de la enfermedad. Se utilizó la prueba de χ^2 para cada una de las enfermedades en las dos etapas para establecer la diferencias entre las variable en ambos grupos p * <0.01, ** <0.001.

Al separar los grupos por fenotipos independientemente de la etapa clínica, podemos ver que hay una diferencia significativa en la prevalencia de neumonía en los fenotipos inductores de sincicios sobre los no inductores y solo una tendencia en el grupo del mismo fenotipo a CMV (Fig. 10).

Para establecer las frecuencias se emplearon todas las manifestaciones reportadas en los expedientes. Como puede observarse, las de mayor frecuencia son las

manifestaciones asociadas a VIH. Otras condiciones no asociadas a VIH también fueron registradas y analizadas, pero por su baja frecuencia se agruparon en la categoría de "otras".

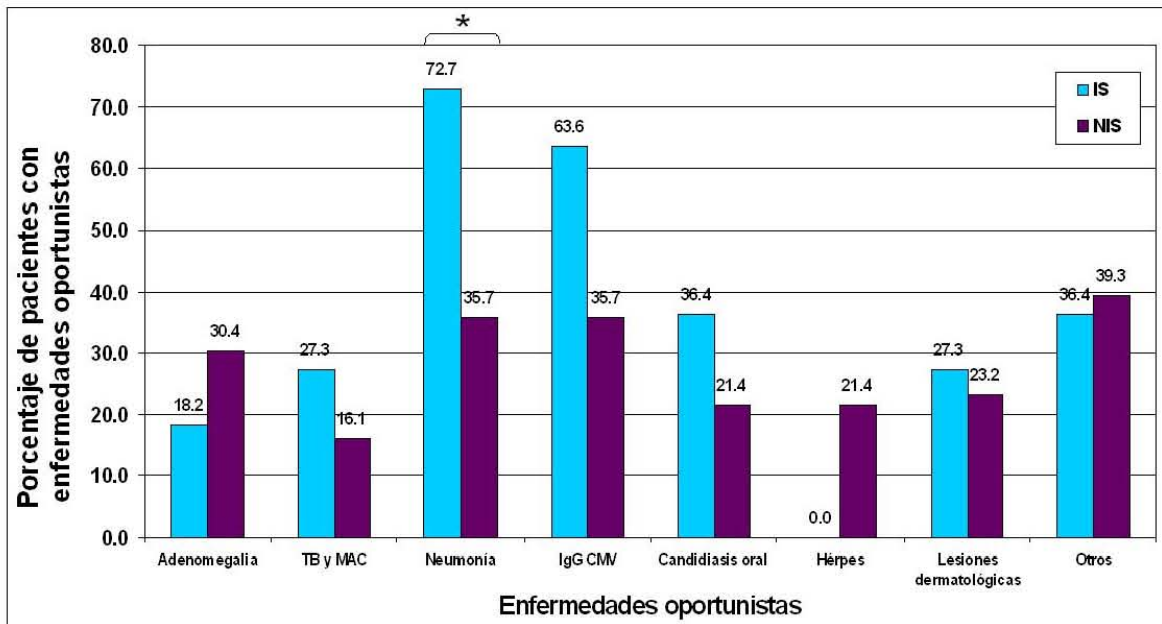


Figura 10. Porcentaje de pacientes con enfermedades oportunistas con fenotipos inductores (IS) y no inductores de sincicios (NIS). Se observa mayor prevalencia de neumonía en fenotipos IS. Las diferencias entre las demás enfermedades no son significativas estadísticamente. Prueba de Chi² para cada una de la enfermedades *p = 0.04

Se realizó regresión lineal para determinar si existe correlación entre los niveles de cT CD4+ y carga viral. Se observó una correlación de $r = 0.542$ y $p < 0.0001$. Es decir, a mayor número de cT CD4+, menores niveles de CV, y de manera inversa, a mayores niveles de CV, menor cuenta de cT CD4+.

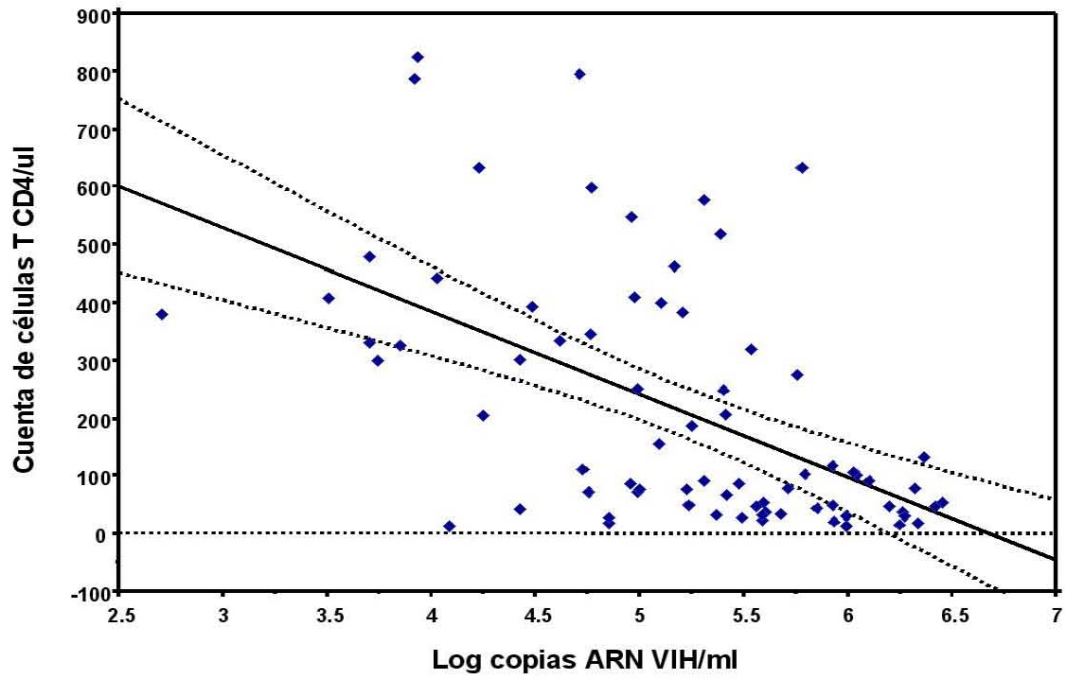


Fig 11. Correlación entre conteo de cT CD4+/ml y la carga viral. $r=0.542$, $p < 0.001$.

DISCUSIÓN

Debido a que se han asociado los fenotipos inductores de sincicios a una rápida evolución de la infección por VIH, es importante realizar la determinación de la frecuencia de este fenotipo en los pacientes con VIH y relacionarla con la etapa y condición clínica del paciente.

Los métodos hasta ahora utilizados para la determinación de fenotipo biológico se basaban en la obtención del virus en cultivo, sin lo cual no era posible determinarlo. Otras técnicas como aquellas basadas en el uso de anticuerpos inmunofluorescentes o el Western blot sólo determinan la presencia de anticuerpos contra el virus, pero no indican la presencia o replicación de este en el donador.⁷¹ El ensayo de determinación fenotípica por MT-2 necesariamente requería muestras de virus viables para replicación, sin embargo recientemente se han desarrollado nuevos métodos para determinar por biología molecular el fenotipo biológico, que requieren validación, como el Phenosense.

Otro problema del método utilizado, es que entre los fenotipos que resultaron inductores de sincicios no se pudo distinguir entre fenotipos X4 y duales (R5X4) ya que esta distinción solo es posible a través de secuenciación⁷² o con el uso de una línea celular que solo permitiera replicación de virus con fenotipo R5; los virus que replicaran en ambas líneas celulares serían los que presentarían el fenotipo R5X4. Durante el desarrollo de este trabajo no se tuvo acceso a esta metodología por lo que se utilizó el método de cultivos con células MT-2.

Se tuvo acceso a 45 muestras de etapa intermedia y 50 de tardía, debido a que en muchos casos, los pacientes ya habían iniciado tratamiento antirretroviral y no se contaba con muestra basal y además debido al bajo número de pacientes en etapa intermedia.

Como se ha descrito⁷³, la media de la cuenta de células T CD4+ circulantes fue significativamente mayor en etapa intermedia que en etapa tardía. Por el contrario, la media de la carga viral plasmática fue significativamente mayor en los pacientes en etapa tardía que en los pacientes de etapa intermedia (Tabla 4).

Los grupos de pacientes estuvieron bien definidos en cuanto a su conteo de carga viral y de células T CD4+, lo cual constatamos estadísticamente en este estudio ya que son dichos niveles los que definen la etapa de la enfermedad en la que se encuentra el paciente. Cuando se compararon las edades y el sexo entre los grupos, no se observó diferencia significativa entre los grupos, nuestra muestra y los datos nacionales. Se tuvieron 89.1% de hombres, comparable al 83.1% que muestran los datos de la epidemia en el país⁷⁴, lo que cabe dentro de los parámetros esperados para una muestra cualquiera y la edad de nuestros pacientes está justo en el rango que estiman las autoridades de salud en el país. Ya que no se observan diferencias entre los grupos, consideramos que las variables de edad y sexo no contribuyen a las diferencias observadas.

Al realizar los cultivos de virus a partir de muestras de plasma de paciente se obtuvo una mayor frecuencia de cultivos positivos en el grupo de etapa tardía, lo cual esperábamos ya que estos pacientes presentan cargas

virales mayores⁷⁵, por lo cual la obtención del virus es más eficiente.

De los métodos para la obtención de VIH en cultivo, como el cultivo de CMSP con estimulación con PHA (fitohematoglutamina) o el cocultivo con células estimuladas por mitógenos⁷⁶, uno de los más sencillos es la obtención de VIH replicativo a partir de plasma, que depende de los niveles de carga viral presentes en dichas muestras. Esto se reflejó en el hecho de que fue posible obtener un mayor número de cultivos positivos en pacientes en etapa tardía que en etapa intermedia, ya que presentaron niveles de CV más altos mientras que en los pacientes en etapa intermedia, al tener niveles de cargas virales más bajas, resultaba más difícil observar la replicación viral, aunque no se descarta que la baja sensibilidad del método utilizado haya influido en la baja proporción de cultivos positivos en este grupo de pacientes.

Al no haber sido posible recuperar el virus en cultivo a partir de plasma en todos los pacientes de etapa intermedia, se consideró aislar el virus a partir de células mononucleares de sangre periférica.

A diferencia de lo observado en los cultivos a partir de plasma, la gran mayoría de los cultivos positivos a partir de células provinieron de los pacientes en la etapa intermedia.

Aunque hay la posibilidad de que exista una diferencia entre el fenotipo biológico de muestras provenientes de cultivos a partir de plasma y las de células mononucleares, no hay evidencia de que esto ocurra. Esto se ha observado solo en cepas de virus obtenidas de reservorios anatómicos distintos por compartamentalización, como semen o líquido

cefaloraquideo, en donde los virus se encuentran relativamente aislados de los virus circulantes en sangre.⁷⁷ Sin embargo, dentro de la dinámica viral se sabe que la mayor parte del virus en plasma es producido por linfocitos T CD4+ activados circulantes, que tienen una vida media corta (1.5 - 2 días)⁷⁸ y contribuyen a más del 95% de la viremia plasmática total, mientras que los viriones libres sobreviven 6 horas en la búsqueda de una célula para infectar para continuar el ciclo. En pacientes sin tratamiento, el número total de viriones que son producidos y liberados está por encima de 10^{10} por día.⁷⁹ Además, la mayoría de los virus en plasma son generados por linfocitos T CD4+ productivamente infectados y la replicación viral en este punto puede ser inhibida efectivamente por terapia antirretroviral en un par de semanas, como se muestra en la caída de viremia en plasma. Las células infectadas de vida larga, tales como macrófagos o linfocitos T CD4+ en reposo contribuyen en una menor proporción a la viremia total. Con estas evidencias consideramos que el virus que recuperamos de plasma refleja las características biológicas del virus recuperado de CMSP.

También se ha descrito que los reservorios virales que podrían contener otras cepas o fenotipos virales solo son inducidas a la replicación en condiciones de activación celular *in vitro*, tales como combinaciones de IL-2/IL-6/FNT- α , IL-7, anti-CD3/anti-CD28 ó PHA/IL-2^{80,81}, las cuales no fueron utilizadas en este ensayo, ya que las muestras de los pacientes solo se cultivaron con IL-2, que no activa los reservorios virales, por lo que la probabilidad de que el virus en plasma y el recuperado en células sean distintos es muy baja.⁸²

Considerando que las etapas de la enfermedad se definieron con base en los niveles de CD4+, la diferencia observada en los niveles de CV era esperada, sin embargo, cuando se compararon los niveles de células CD4+ y CV entre los fenotipos, se encontró una relación entre el fenotipo IS y bajos niveles de CD4+ (Tabla 7), a diferencia de los niveles de CV que parecen no tener relación con algún fenotipo en particular. Es posible que estos bajos niveles estén asociados al efecto citopático de los virus con fenotipo linfotrópico, pero no podemos asegurarlo debido a que dicho fenómeno puede deberse a otras variables no asociadas a fenotipo, como apoptosis o procesos citolíticos⁸³, destrucción de células infectadas por procesos inmunológicos y la baja regeneración de cT CD4+.⁸⁴ Hay que considerar que las células T CD4+ CCR5+ son altamente utilizadas en las etapas primarias de la infección, disminuyendo su frecuencia, mientras que los cambios de fenotipo suceden las etapas avanzadas.⁸⁵

Al relacionar las etapas de la enfermedad con la prevalencia de enfermedades oportunistas, como ya se ha descrito⁸⁶, observamos que existe una mayor prevalencia de neumonía, candidiasis oral y micobacteriosis (tuberculosis y MAC) en los pacientes de etapa tardía, a diferencia de la etapa intermedia. En etapa intermedia se observa una mayor frecuencia de adenomegalias, características de la respuesta inmune en dicha etapa. Aunque se ha reportado que existe una mayor frecuencia de condiciones clínicas asociadas a CMV en etapa avanzada (<100 CD4+/ μ l), no fue posible encontrar esta asociación debido a que en los expedientes no se describen condiciones clínicas, sino que se reporta la presencia de IgG por CMV, que indica una infección, pero

no de manifestación clínica de la enfermedad y puede ser que por esta razón no se encontraron diferencias entre las etapas (Fig. 9).

Al comparar el estado clínico con los fenotipos biológicos, solo se encontró asociación entre el fenotipo IS y una mayor prevalencia de neumonía, lo cual es concordante con el hecho de que esta condición clínica se presenta en individuos con niveles bajos de células T CD4+, respaldado por la asociación existente entre bajos niveles de CD4+ y el fenotipo IS (Fig. 10). Sin embargo, el tipo de institución en donde se realizaron estos estudios, cuya especialidades son las enfermedades respiratorias pudo haber influido (y seguramente lo hizo) en este dato. Para subsanar este asunto habría que comparar datos a nivel poblacional.

Actualmente, el desarrollo de nuevos métodos de determinación de fenotipos biológicos, ha permitido la valoración de tratamientos específicos para cada una de las cepas, como por ejemplo T-20⁸⁷ que requiere de la fenotipificación previa para implementarlo, y dado que actualmente, el uso de medicamentos antirretrovirales es el único método de control de la infección, es importante, seguir realizando investigación sobre los efectos de estos tratamientos en los distintos fenotipos biológicos de VIH.

-
- 71 Castro BA, Weiss CD, Wiviott LV, Levy AJ, 1988, Optimal Conditions for Recovery of the Human Immunodeficiency Virus from Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Journal Of Clinical Microbiology*. 2371-2376
- 72 Fouchier RAM, Groenink M, Kootstra, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schiutemaker H. 1992. Phenotype-associated sequence variation in the third variable domain region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule, *Journal of Virology*, Vol 66 No 5: 3183-6780.
- 73 Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PTA, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F. 1989. Evidence for a role of virulent human immunodeficiency virus (HIV) variants in the pathogenesis of acquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *Journal of Virology*, 63: 2118-2125.
- 74 SSA, Dirección General de Epidemiología, Registro Nacional de Casos de SIDA, 2006.
- 75 Simon V, Ho DD. 2003. HIV-1 dynamics in vivo: Implications for therapy. *Nature Review of Microbiology*, 1: 181-190.
- 76 Castro BA, Weiss CD, Wiviott LV, Levy AJ, 1988, Optimal Conditions for Recovery of the Human Immunodeficiency Virus from Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Journal Of Clinical Microbiology*. 2371-2376
- 77 Delwart EL, Mullins JI, Gupta P, Learn Jr, Holodniy M, Katzenstein D, Walker BD, Singh MK. 1998. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Populations in Blood and Semen. *Journal of Virology*, Vol 7, No 1, pp. 617-623.
- ⁷⁸ Ho, DD, Neuman AU, Perelson AS, Chen W, Leonard JM, Markowitz M. 1995. Rapid turnover of plasma virions and CD4 lymphocytes in HIV infection. *Nature* 373, 123-126.
- 79 Simon V, Ho DD. 2003. HIV-1 dynamics in vivo: Implications for therapy. *Nature Review of Microbiology*, 1: 181-190.
- 80 Feng-Xiang Wang, Yan Xu, Sullivan J, Souder E, Argyris E, Acheampong EA, Fisher

-
- J, Sierra M, Thomson MM, Najera R, Frank I, Kulkosky J, Pomerantz RJ, Nunnari G. 2005. IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *The Journal of Clinical Investigation*, Vol. 115 No 1. 81
- Pessler, F. Cron, R.Q. Reciprocal regulation of the nuclear factor of activated T cells and HIV-1, *Genes and Immunity*, 2004; 5:158-167.
- 82 Chun TW, et. al. 1997a
- 83 Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain. capítulo 20.
- ⁸⁴ Lawn SD, Butera ST, and Folks TM. 2001. Contribution of immune activation to the pathogenesis and transmission of human immunodeficiency virus type 1 infection, *Clin Microbiol Rev* 14, 753-77.
- ⁸⁵ Veazey RS, Mansfield KG, Tham IC, Carville AC, Shvetz DE, Forand AE & Lackner AA. 2000. Dynamics of CCR5 expression by CD4+ T cells in lymphoid tissues during simian immunodeficiency virus infection. *J Virol* 74, 11001-11007.
- 86 Coffin JM, Hughes SH, Varnus HE. *Retroviruses: Pathogenesis of HIV and SIV*. National Centre of Biotechnology Information.
- ⁸⁷ Menzo S, Castagna A, Monchetti A, et al. 2004. Genotype and phenotype patterns of human immunodeficiency virus type 1 resistance to Enfuvirtide during long term treatment. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 48(9) 3253-3259.

CONCLUSIONES.

La relación que encontramos entre el fenotipo viral y los niveles de células T CD4+, no solo representa la transición de una etapa de la enfermedad a otra por el descenso de células T, sino que también refleja la condición citopática de los fenotipos. Aunque dicha condición no se vio reflejada directamente en una mayor frecuencia de enfermedades oportunistas en los pacientes que presentaron este fenotipo (excepto neumonía, que si presentó una relación más directa), pero esto puede estar influenciado por el tipo de institución en donde se realizó el estudio.

A pesar de que los pacientes en etapa tardía poseen niveles de cT CD4+ más bajos, cargas virales más altas y una mayor frecuencia de fenotipos IS, en este estudio no se encontró relación directa entre esta condición y una mayor frecuencia de enfermedades oportunistas o un estado clínico más inmunocomprometido. Lo cual puede deberse al desconocimiento que se tiene aún de las razones del surgimiento de cepas IS en etapas temprana o intermedia de la enfermedad, que aceleran en algunos casos los efectos citopáticos, o a la falta de conocimiento de los procesos de transición fenotípica y sus repercusión en el curso de la enfermedad y estado clínico de los pacientes.

Al ser el fenotipo, en la interacción con los correceptores y la entrada del virus a la célula factores determinantes en el proceso de infección y en el curso de la enfermedad, es importante profundizar en el estudio de los procesos de reconocimiento virus-célula, el uso de receptores y correceptores y los efectos y características de cada uno de los fenotipos

virales para establecer pautas de investigación hacia la búsqueda de una vacuna y mejora de tratamientos.

BIBLIOGRAFÍA

1. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W & Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
2. Rey MA, Spire B, Dormont D, Barre-Sinoussi F, Montagnier L, Chermann JC. 1984. Characterization of the RNA dependent DNA poly merase of a new human T-lymphotropic retrovirus (lymphadenopathy associated virus). *Biochem Biophys. Res. Commun*, 121 (1): 126-133.
3. Coffin JM, Hughes SH, Varnus HE. *Retroviruses: Patogenesis of HIV and SIV*. National Centre of Biotechnology Information.
4. Gartner LP, & Hiatt JL. *Texto Atlas de Histología*, McGraw Hill, 2001. pp 263.
5. Coffin JM, Hughes SH, Varnus HE. *Retroviruses: Patogenesis of HIV and SIV*. National Centre of Biotechnology Information
6. Rosenberg ZF, Foaucci AS. 1989. The immunopathogenesis of HIV infection. *Adv. Immunol.* 47: 377-431.
7. Barre-Sinoussi F, Chermann JC, Rey F, Nugeyre MT, Chamaret S, Gruest J, Dautet C, Axler-Blin C, Vezinet-Brun F, Rouzioux C, Rozenbaum W & Montagnier L. 1983. Isolation of a T-lymphotropic retrovirus from a patient at risk of acquired immune deficiency syndrome (AIDS). *Science* 220: 868-871.
8. Gottlieb MS, Schanker HM, Fan PT, Saxson A, & Weisman JD. 1981. Mortality and Morbidity Week Report. 30 (21): 1-3.
9. ONUSIDA. Situación de la epidemia de SIDA. Diciembre de 2006. ONU
10. SSA, Dirección General de Epidemiología, Registro Nacional de Casos de SIDA, 2006.
11. ONUSIDA. Situación de la epidemia de SIDA: Diciembre de 2006.
12. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. *Cellular and molecular immunology*. McGraw-Hill-Interamericana. Spain. capítulo 20.
13. Berger EA, Murphy PM & Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism and disease. *Annual Review of Immunology* 17: 657-700.
14. Dimitrov DS. 2000. Cell biology of virus entry. *Cell*, 101: 697-702.
15. Coffin JM, Hughes SH, Varnus H. *Retroviruses*. Cold Spring Harbor Laboratory Press: 1998.
16. Hope TJ, Trono D. 2002. Structure, expression and regulation of the HIV genome. De: *HIV InSite Knowledge Base Chapter*.

17. Hope TJ, Trono D. 2002. Structure, expression and regulation of the HIV genome. De: HIV InSite Knowledge Base Chapter.
18. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain.
19. Hope TJ, Trono D. 2002. Structure, expression and regulation of the HIV genome. De: HIV InSite Knowledge Base Chapter.
20. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain. p.p. 473.
21. Earl PL, Doms RW, Moss B. 1990. Oligomeric structure of the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein. Proc Natl Acad Sci USA, 87:648-652.
22. Brelot A, Alizon M. 2001. HIV-1 entry and how to block it. AIDS, 15 (suppl 5): s3-s11.
23. Ugolini S, Mondor I, Sattentau QJ. 1999. HIV-1 attachment; another look. Trends Microbiol, 7:144-149.
24. Blair WS, Lin PF, Meanwell NA, Wallace OB. 2000. HIV-entry, an expanding portal for drug discovery. Drug Discovery Today, 5:183-194.
25. Monck JR, Fernández JM. 1996. The fusion pore and mechanism of biological membrane fusion. Curr Opin Cell Biology, 8: 524-533.
26. Kliger Y, Gallo SA, Peisajovich SG, et. al. 2001. Mode of action of an antiviral peptide from HIV-1, Inhibition at a post-lipid mixing stage. Journal of Biological Chemistry, 276:1391-1397.
27. Kilby JM, Eron JJ. 2003. Novel therapies based on mechanisms of HIV-1 cell entry. The New England Journal of Medicine 348: 2228-38
28. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain, p.p. 475.
29. Haase AT. 1999. Population Biology of HIV-1 Infection: Viral and CD4+ T Cell Demographics and Dynamics in Lymphatic Tissues. Ann. Rev. Immunol. 17:625-656.
30. Chun TW, et al. 1997. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. Nature, 387: 187-188.
31. Pessler F, Cron RQ. 2004. Reciprocal regulation of the nuclear factor of activated T cells and HIV-1, Genes and Immunity, 5:158-167.
32. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain, 184-185.
33. Hope TJ, Trono D. 2002. Structure, expression and regulation of the HIV genome. De: HIV InSite Knowledge Base Chapter.
34. Manns A, König H, Baierl M, Kurth M, and Grosse F. 1991. Fidelity of reverse transcriptase of the simian immunodeficiency virus from African green monkey. Nucleic Acids Research, Vol. 19, No. 3 533-38.

35. Simon V, Ho DD. 2003. HIV-1 dynamics in vivo: Implications for therapy. *Nature Review of Microbiology*, 1: 181-190.
36. Finzi D, Siliciano
37. Mattapallil JJ, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Martín M & Roederer M. 2005. Massive infection and loss of memory CD4 + T cells in multiple tissues during acute SIV infection, *Nature*, Vol 434, pp 1903-7.
38. Zack JA, Arrigo SJ, Weitsman SR, Go AS, Haislip A, and Chen ISY. 1990. HIV-1 entry into quiescent primary lymphocytes: molecular analysis reveals a labile, latent viral structure. *Cell* 61, 213-222.
39. Bukrinsky MI, Sharova N, Dempsey MP, Stanwick TL, Bukrinskaya AG, Haggerty S, and Stevenson M. 1992. Active nuclear import of human immunodeficiency virus type 1 preintegration complexes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89, 6580-6584.
40. Spina CA, Guatelli JC and Richman DD. 1995. Establishment of a stable, inducible form of human immunodeficiency virus type 1 DNA in quiescent CD4 lymphocytes *in vitro*. *J. Virol.* 69, 2977-2988.
41. Zhang ZQ, et, al. 1999. Sexual transmisión and propagation of SIV and HIV in resting and activated CD4+ T cells. *Science*. 286:1353-1357.
42. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain, p.p. 482.
43. Perelson AS, Essunger P, and Ho DD. 1997b. Dynamics of HIV-1 and CD4 • lymphocytes in vivo. *AIDS* 11 (Suppl. A) S17-S34.
44. Bukrinsky MI, Stanwick TL, Dempsey MP, and Stevenson M. 1991. Quiescent T lymphocytes as an inducible virus reservoir in HIV-1 infection. *Science* 254, 423-427.
45. Chun TW, Carruth L, Finzi D, She, X, Diguseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, et al. 1997a. Quantitation of latent tissue reservoirs and total body load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-188.
46. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, Diguseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, et. al. 1997a. Quantitation of latent tissue reservoirs and total body load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-188.
47. Pantaleo G, Graziosi C, Fauci AS, 1993. New concepts in the immunopathogenesis of human immunodeficiency virus infection. *N. Engl. J. Med*, 328: 327-335
48. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain.
49. Klatzmann D, Champagne E, Chamaret S, Gruest J, Guetard D, Hercend T, Gluckman JC, Montagnier L. 1984.

- T-lymphocyte T4 molecule behaves as the receptor for human retrovirus LAV. *Nature* 312: 767-768.
50. Dalglish AG, Beverly PCL, Clapham PR, Crawford DH, Greaves MF, Weiss RA. 1984. The CD4 (T4) antigen in an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312: 763-766
 51. Clapman PR, McNight A, Weiss RA. 1992. Human immunodeficiency virus type 2 infection and fusion of CD4-negative human cell lines: induction and enhancement with soluble CD4. *Journal of Virology* 66:3531-3537.
 52. Feng Y, Broder CC, Kennedy PE, Berger EA. 1996. HIV entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven-transmembrane, G protein-coupled receptor. *Science* 272: 872-77.
 53. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain.
 54. Gartner LP, & Hiatt JL. *Texto Atlas de Histología*, McGraw Hill, 2001. pp 263.
 55. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacology Review* 2000, 52:145-176.
 56. Oberlin E, Amara A, Bachelier F. 1996, The CXC chemokine SDF-1 is the ligand for LESTR/fusin and prevents infection cy T-cell-line-adapted HIV-1. *Nature* 382:833-835.
 57. Michael NL, Nelson JA, Kewalramani VN. 1998. Exclusive and persistent use of the entry correceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta 32. *Journal of Virology*, 72: 6040-6047.
 58. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacology Review* 2000, 52:145-176.
 59. Cocchi F, DeVicco AL, Garzino-Demo A, Arya SK, Gallo RC, Lusso P. 1995. Identification of RANTES, MIP- α y MIP-1 β as the major HIV-suppressive factors produced by CD8+ T cells, *Science* 270:1811-1815.
 60. Deng HK, Lui R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhardt M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. 1996. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature* 381: 661-66
 61. Alkhatib G, Combadiere C, Broder CC, Feng Y, Kennedy PE, Murphy PM, Berger EA. 1996. CC CKR5: a RANTES, MIP-1 α MIP-1 β receptor as a fusion cofactor for macrophage-tropic HIV-1. *Science* 272: 1955-58
 62. Samson M, Libert F, Doranz BJ, 1996, Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene, *Nature* 382: 722-725.
 63. Connor RI, Sheridan KE, Ceradini D, Choe S, Landau NR. 1997. Change in coreceptor usage correlates with

- disease progresión in HIV-1infected individuals. *J, Exp. Med* Vol 185, No 4: 621-627.
64. Samson M, Libert F, Doranz BJ, 1996, Resistance to HIV-1 infection in caucasian individuals bearing mutant alleles of the CCR5 chemokine receptor gene, *Nature* 382: 722-725.
 65. Michael NL, Nelson JA, Kewalramani VN. 1998. Exclusive and persistent use of the entry correceptor CXCR4 by human immunodeficiency virus type 1 from a subject homozygous for CCR5 delta 32. *Journal of Virology*, 72: 6040-6047.
 66. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. *Cellular and molecular immunology*. McGraw-Hill-Interamericana. Spain
 67. Hoxie JA, LaBranche CC, Endres MJ, et al. 1998. CD4-independent utilization of the CXCR4 chemokine receptor by HIV-1 and HIV-2. *J Reprod Immunology* 41:197-211.
 68. Joseph J, Mattapallil, Douek DC, Hill B, Nishimura Y, Malcolm Martin & Mario Roederer. 2005. Massive infection and loss of memory CD4 + T cells in multiple tissues during acute SIV infection, *Nature*, Vol 434, pp 1903-7.
 69. Berger EA, Murphy PM & Farber JM. 1999. Chemokine receptors as HIV-1 coreceptors: Roles in viral entry, tropism ans disease. *Annual Review of Immunology* 17:657-700.
 70. Cocchi F, DeVico AL, Garzino-Demo A, Cara A, Gallo RC, Lusso P. 1996. The V3 domain of the HIV-1 gp120 envelope glycoprotein is critical for chemokine-mediated blockade of infection. *Nat Med* 2: 1244-1247.
 71. Castro BA, Weiss CD, Wiviott LV, Levy AJ, 1988, Optimal Conditions for Recovery of the Human Immunodeficiency Virus from Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Journal Of Clinical Microbiology*. 2371-2376
 72. Fouchier RAM, Groenink M, Kootstra, Tersmette M, Huisman HG, Miedema F, Schiutemaker H. 1992. Phenotype-associated sequense variation in the third variable domain region of the human immunodeficiency virus type 1 gp120 molecule, *Journal of Virology*, Vol 66 No 5: 3183-6780.
 73. Tersmette M, Gruters RA, de Wolf F, de Goede RE, Lange JM, Schellekens PTA, Goudsmit J, Huisman HG, Miedema F. 1989. Evidence for a role of virulen human immunodeficiency virus (HIV) variants in the patogenesis of aquired immunodeficiency syndrome: studies on sequential HIV isolates. *Journal of Virology*, 63: 2118-2125.
 74. SSA, Dirección General de Epidemiología, Registro Nacional de Casos de SIDA, 2006.
 75. Simon V, Ho DD. 2003. HIV-1 dynamics in vivo: Implications for therapy. *Nature Reviw of Microbiology*, 1: 181-190.
 76. Castro BA, Weiss CD, Wiviott LV, Levy AJ, 1988, Optimal Conditions for Recovery of the Human

- Immunodeficiency Virus from Peripheral Blood Mononuclear Cells, *Journal Of Clinical Microbiology*. 2371-2376
77. Delwart EL, Mullins JI, Gupta P, Learn Jr, Holodniy M, Katzenstein D, Walker BD, Singh MK. 1998. Human Immunodeficiency Virus Type 1 Populations in Blood and Semen. *Journal of Virology*, Vol 7, No 1, pp. 617-623.
 78. Chun TW, Carruth L, Finzi D, Shen X, Digiuseppe JA, Taylor H, Hermankova M, Chadwick K, Margolick J, Quinn TC, et. al. 1997a. Quantitation of latent tissue reservoirs and total body load in HIV-1 infection. *Nature* 387, 183-188.
 79. Simon V, Ho DD. 2003. HIV-1 dynamics in vivo: Implications for therapy. *Nature Review of Microbiology*, 1: 181-190.
 80. Feng-Xiang Wang, Yan Xu, Sullivan J, Souder E, Argyris E, Acheampong EA, Fisher J, Sierra M, Thomson MM, Najera R, Frank I, Kulkosky J, Pomerantz RJ, Nunnari G. 2005. IL-7 is a potent and proviral strain-specific inducer of latent HIV-1 cellular reservoirs of infected individuals on virally suppressive HAART. *The Journal of Clinical Investigation* Volume 115 No 1.
 81. Pessler, F. Cron, R.Q. Reciprocal regulation of the nuclear factor of activated T cells and HIV-1, *Genes and Immunity*, 2004; 5:158-167.
 82. Chun TW, et. al. 1997a
 83. Abbas AK, Lichtman AH, Pober JS. 2002. Cellular and molecular immunology. McGraw-Hill-Interamericana. Spain. capítulo 20.
 84. Coffin JM, Hughes SH, Varnus HE. *Retroviruses: Patogenesis of HIV and SIV*. National Centre of Biotechnology Information.